

## (12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局(43)国際公開日  
2001年7月5日 (05.07.2001)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 01/48188 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K 14/705, 16/28, C12P 21/02, C12Q 1/02, 1/68, A61K 31/711, 48/00, A61P 43/00, G01N 33/15, 33/50

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/09408

(22) 国際出願日: 2000年12月28日 (28.12.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/375152 1999年12月28日 (28.12.1999) JP  
特願2000/101339 2000年3月31日 (31.03.2000) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社  
ヘリックス研究所(HELIX RESEARCH INSTITUTE)  
[JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番地3  
Chiba (JP).

(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 松本俊一郎  
(MATSUMOTO, Shun-ichiro) [JP/JP]; 〒273-0005 千葉  
県船橋市本町4-43-2-605 Chiba (JP). 小田環(ODA,  
Kumi ODA) [JP/JP]; 〒292-0054 千葉県木更津市長須賀  
392-203 Chiba (JP). 斎藤洋子(SAITO, Youko) [JP/JP];  
〒292-0043 千葉県木更津市東太田4-5-13-103 Chiba  
(JP). 森川記行(MORIKAWA, Noriyuki) [JP/JP]; 〒292-  
0833 千葉県木更津市貝瀬3-9-17-408 Chiba (JP). 吉田  
賢二(YOSHIDA, Kenji) [JP/JP]; 〒292-0043 千葉県木  
更津市東太田4-11-1-302 Chiba (JP). 諏訪牧子(SUWA,  
Makiko) [JP/JP]; 〒144-0052 東京都大田区蒲田1-24-4  
Tokyo (JP). 杉山友廉(SUGIYAMA, Tomoyasu) [JP/JP];  
〒292-0045 千葉県木更津市清見台2-6-23-102 Chiba  
(JP). 岸本利光(KISHIMOTO, Toshimitsu) [JP/JP]. 神  
崎康治(KANZAKI, Kouji) [JP/JP]. 保田慎一郎(YA-  
SUDA, Shin-ichiro) [JP/JP]. 井上佳久(INOUE, Yoshi-  
hisa) [JP/JP]; 〒573-1153 大阪府枚方市招提大谷2-25-1  
ウェルファイド株式会社 創業研究所内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒  
300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
Ibaraki (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,  
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,  
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,  
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[競業有]

(54) Title: NOVEL GUANOSINE TRIPHOSPHATE-BINDING PROTEIN-COUPLED RECEPTORS, GENES THEREOF AND  
PRODUCTION AND USE OF THE SAME(54) 発明の名称: 新規なグアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製  
造および用途(57) Abstract: Nine novel genes sustaining hydrophobic domains, which are seemingly 7 transmembrane domains characteristic  
to G protein-coupled receptors, are successfully isolated by human tissue cDNA screening. These genes and proteins which are the  
expression products thereof are usable in screening ligands, screening agonists or antagonists which are useful as drugs, diagnosing  
diseases in which these gene participate, etc.

(57) 要約:

A1

ヒト組織cDNAのスクリーニングにより、G蛋白質共役型受容体の特徴である  
7個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を保持する9種類の新規遺伝子を  
単離することに成功した。これら遺伝子やその翻訳産物である蛋白質は、リガン  
ドのスクリーニングや医薬品として有用なアゴニストやアンタゴニストのスクリ  
ーニング、さらにはこれら遺伝子が関連する疾患の診断などに利用し得る。

WO 01/48188



(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

- 1 -

## 明細書

# 新規なグアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体およびそれらの遺伝子、 並びにそれらの製造および用途

### 技術分野

本発明は、新規な G 蛋白質共役型受容体およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関する。

### 背景技術

G 蛋白質共役型受容体(G protein-coupled receptors)は、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜受容体群の総称である。G 蛋白質共役型受容体は、分子内に細胞膜貫通領域を 7 回有する構造上の特性から、「7 回膜貫通型受容体」とも呼ばれる。G 蛋白質共役型受容体は様々な生理活性物質の情報を、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化、それにより引き起こされる細胞内セカンドメッセンジャーの変動を介して細胞膜から細胞内へと伝達する。三量体型 GTP 結合蛋白質により制御される細胞内セカンドメッセンジャーは、アデニレートシクラーゼを介する cAMP、フォスフォリバーゼ C を介する  $\text{Ca}^{2+}$  などがよく知られているが、三量体型 GTP 結合蛋白質を介したチャネルの制御、リン酸化酵素の活性化など多くの細胞蛋白がその標的となっていることが最近明らかとなってきた (Annu. Rev. Neurosci. (97) 20:399)。G 蛋白質共役型受容体に対する基質 (リガンド) は、大変多岐に渡っており、タンパク性ホルモン、ケモカイン、ペプチド、アミン、脂質由来物質、さらにはトロンビンの様なプロテアーゼもその一例となる。現在、遺伝子が同定された G 蛋白質共役型受容体の数は感覚器受容体を除くと、ヒトで 300 個弱存在するが、リガンドが同定された G 蛋白質共役型受容体の数は、そのうち約 140 種類に過ぎず、リガンド

- 2 -

ド未知な「オーファン G 蛋白質共役型受容体」が 100 種類以上存在している。しかしながら実際のヒトゲノム中には、少なくとも 400 種類、場合によっては 1 000 種類もの G 蛋白質共役型受容体が存在する、とも想定されている (*Trends Pharmacol. Sci.* (97) 18:430)。この事は、今後のゲノム解析の飛躍的進展に伴って、機能未知なオーファン G 蛋白質共役型受容体の数も爆発的に増加する事を意味している。

これまでに世界の製薬企業により創られてきた薬剤は、その 9 割以上が細胞外空間での相互作用を標的としており、その中でも G 蛋白質共役型受容体に関連する低分子薬は大部分を占めている。その根拠としては、G 蛋白質共役型受容体が関連する疾患が、遺伝的疾患を始めとして、脳神経系、循環器系、消化器系、免疫系、運動器系、泌尿器生殖器系など、非常に多くの領域に関連することにある。そのため、最近では多くの製薬企業がゲノム解析で明らかとなったオーファン G 蛋白質共役型受容体を所有し、リガンド探索と生理機能の解明に鋭意を削っている。こうした状況を背景として、最近では新規 G 蛋白質共役型受容体の生理的リガンド探索の成功例も報告され始めている。例えば、calcitonin gene-related peptide 受容体 (*J. Biol. Chem.* (96) 271:11325)、orexin (*Cell* (98) 92:573) そして prolactin-releasing peptide (*Nature* (98) 393:272)などの事例は、生命科学分野での基礎研究としても大きな衝撃を持つ事例であった。

特に、オーファン G 蛋白質共役型受容体は新たな薬剤開発に繋がる可能性の高い標的として、多大な注目を集めている。一般的にオーファン G 蛋白質共役型受容体には特異的なリガンドが存在しないため、そのアゴニスト、アンタゴニストを開発することは困難であった。しかし、近年、充実された化合物ライブラリーとハイスクループットスクリーニングと組み合わせることで、オーファン G 蛋白質共役型受容体を標的とした薬剤の創製が提唱されている (*Trends Pharmacol. Sci.* (97) 18:430, *Br. J. Pharm.* (98) 125:1387)。すなわち、遺伝子操作によって同定されたオーファン G 蛋白質共役型受容体を、細胞内セカンドメッ

- 3 -

センジャーである cAMP,  $Ca^{2+}$ の変化を指標とした機能スクリーニングにより生理的アゴニストを発見し、生体内機能解析を行うというものである。この際、化合物ライブラリーを利用して、スクリーニングをハイスループット化することにより、オーファン G 蛋白質共役型受容体に対する特異的な代替 (surrogate) アゴニスト及びアンタゴニストの発見、ひいては特定の疾患治療薬の開発も理論的には可能となる。

#### 発明の開示

本発明は、このような G 蛋白質共役型受容体を取り巻く現状に鑑みてなされたものであり、その目的は新規な G 蛋白質共役型受容体およびその遺伝子、並びにそれらの製造方法及び用途を提供することにある。さらにこれら分子を薬剤開発研究の標的として提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ヒト組織 cDNA を鋳型にしたポリメラーゼ連鎖反応を実施することにより、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を保持する 9 種類の新規遺伝子を単離することに成功した。これら遺伝子やその翻訳産物である蛋白質は、リガンドのスクリーニングや医薬品として有用なアゴニストやアンタゴニストのスクリーニング、あるいはこれら遺伝子が関連する疾患の診断に利用し得る。

即ち、本発明は、新規な G 蛋白質共役型受容体およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関し、より具体的には、

- (1) グアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体をコードする下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA、
  - (a) 配列番号：1 から 4、17 から 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA、

- 4 -

(b) 配列番号：5から8、22から26のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含むDNA、

(c) 配列番号：1から4、17から21のいずれかに記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA、

(d) 配列番号：5から8、22から26のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA、

(2) 配列番号：1から4、17から21のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードするDNA、

(3) (1) または (2) に記載のDNAを含有するベクター、

(4) (1) または (2) に記載のDNAまたは (3) に記載のベクターを保持する形質転換体、

(5) (1) または (2) に記載のDNAによりコードされる蛋白質またはペプチド、

(6) (4) に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、(5) に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法、

(7) (5) に記載の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法であって、

(a) (5) に記載の蛋白質またはペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該蛋白質またはペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法、

(8) (5) に記載の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検試料の存在下で (5) に記載の蛋白質またはその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、

- 5 -

(b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程 (a) で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(9) (5) に記載の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で該蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、

(b) 該リガンドの該蛋白質への結合による細胞における変化を検出する工程、

(c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程 (b) で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(10) 細胞における変化が、cAMP 濃度の変化またはカルシウム濃度の変化である、(8) または (9) に記載の方法、

(11) (5) に記載の蛋白質に結合する抗体、

(12) (7) から (10) のいずれかに記載のスクリーニングにより単離される化合物、および

(13) (12) に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物、および

(14) 癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の治療のための、(13) に記載の医薬組成物、

(15) 配列番号：5 から 8、22 から 26 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチド、

(16) 癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の診断方法であって、被検者由来の該疾患に関連した組織における (1) に記載の DNA の発現、または被検者における (1) に記載の DNA の変異を検出することを含む方法、

- 6 -

(17) (11) に記載の抗体または (15) に記載のヌクレオチドを含む、癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の診断薬、を提供するものである。

なお、本発明において「G 蛋白質共役型受容体」とは、GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜受容体を指す。

本発明において「リガンド」とは、G 蛋白質共役型受容体に結合し、細胞内にシグナルを伝達する生理的物質を指す。ここで「生理的物質」とは、生体内で G 蛋白質共役型受容体に結合している化合物を指す。

本発明において「アゴニスト」とは、G 蛋白質共役型受容体に結合し、細胞内にシグナルを伝達しうる化合物を指し、生理的物質、人工的に合成した化合物、天然由来の化合物を含む。

本発明において「アンタゴニスト」とは、リガンドが G 蛋白質共役型受容体に結合すること、もしくは細胞内にシグナルを伝達することを阻害する化合物を指し、生理的物質、人工的に合成した化合物、天然由来の化合物を含む。

本発明は、新規な G 蛋白質共役型受容体および該蛋白質をコードする DNA を提供する。本発明に含まれる、本発明者等により単離された 9 のヒト由来の cDNA A クローンを、「GPRv8」、「GPRv12」、「GPRv16」、「GPRv21」、「GPRv40」、「GPRv47」、「GPRv51」、「GPRv71」、「GPRv72」と命名した（必要に応じてこれらクローンをまとめて「GPRv」と称する）。これら cDNA の塩基配列を配列番号：5 から 8、22 から 26 に、該 cDNA によりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：1 から 4、17 から 21 に示す。

BLAST 検索の結果、GPRv cDNA がコードする蛋白質は、いずれも既知の G 蛋白質共役型受容体と有意なアミノ酸配列上の相同性を示した。具体的には、「GPRv8」は HUMAN VASOPRESSIN V1B RECEPTOR (P47901, 424aa) に対して 36% の相同性を、「GPRv12」は RAT 5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (P31388, 436aa) に対して 27% の相同性を、「GPRv16」は MOUSE GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (P56479

, 348aa)に対して 28%の相同性を、「GPRv21」は BOVIN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (P79113, 384aa)に対して 30%の相同性を、「GPRv40」は OXYTOCIN RECEPTOR (P97926, 388aa)に対して 34%の相同性を、「GPRv47」は GPRX\_ORYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (Q91178, 428aa)に対して 43%の相同性を、「GPRv51」は PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RTA (P23749, 343aa)に対して 37%の相同性を、「GPRv71」は Chicken P2Y PURINOCEPTOR 3 (P2Y3) (Q98907, 328aa)に対して 45%の相同性を、「GPRv72」は ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (O02824, 466aa)に対して 30%の相同性をそれぞれ示した。

また、本発明者等が単離した GPRv cDNA がコードする蛋白質（以下、「GPRv 蛋白質」と称することがある）は、いずれも G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を保持していた。これら事実から、GPRv cDNA は、いずれも G 蛋白質共役型受容体ファミリーに属する蛋白質をコードしていると考えられる。G 蛋白質共役型受容体は、そのリガンドの作用により G 蛋白質の活性化を通じて細胞内ヘシグナル伝達を行なう活性を有しており、上記したように遺伝的疾患を始めとして、脳神経系、循環器系、消化器系、免疫系、運動器系、泌尿器生殖器系などの非常に多くの領域の疾患に関連している。従って、GPRv 蛋白質は、GPRv 蛋白質の機能を調節するアゴニストやアンタゴニストなどのスクリーニングに利用することができ、上記疾患に対する医薬品の開発の重要な標的となる。

本発明は、また、GPRv 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。ここで「機能的に同等」とは、対象となる蛋白質が GPRv 蛋白質と同等の生物学的特性を有していることを意味する。GPRv 蛋白質が持つ生物学的特性としては、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内ヘシグナル伝達を行なう活性が挙げられる。三量体型 GTP 結合蛋白質は、活性化する細胞内伝達系の種類によって、 $Ca^{2+}$ を上昇させる Gq 型、cAMP を上昇させる Gs 型、そして cAMP を抑制する Gi 型の 3 種類のカテゴリーに分類される (*Trends Pharmacol. Sci.* (99) 20:118)。

- 8 -

従って、対象となる蛋白質が GPR<sub>v</sub> 蛋白質と同等の生物学的特性を有しているか否かは、例えば、その活性化による細胞内の cAMP 濃度もしくはカルシウム濃度の変化を検出することにより評価することが可能である。

GPR<sub>v</sub> 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を調製するための方法の 1 つの態様としては、蛋白質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法が挙げられる。このような方法には、例えば、部位特異的変異誘発法(*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 8.1-8.5) が含まれる。また、蛋白質中のアミノ酸の変異は、自然界において生じることもある。本発明には、このように人工的か自然に生じたものかを問わず、GPR<sub>v</sub> 蛋白質のアミノ酸配列(配列番号: 1 から 4、17 から 21)において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／もしくは付加などにより変異した蛋白質であって、GPR<sub>v</sub> 蛋白質と機能的に同等な蛋白質が含まれる。これら蛋白質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、GPR<sub>v</sub> 蛋白質の機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の 10% 以内であり、好ましくは全アミノ酸の 5% 以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の 1% 以内であると考えられる。

GPR<sub>v</sub> 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を調製するための方法の他の態様としては、ハイブリダイゼーション技術あるいは遺伝子增幅技術を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術(*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.3-6.4)を利用して GPR<sub>v</sub> 蛋白質をコードする DNA 配列(配列番号: 5 から 8、22 から 26) またはその一部をもとに同種または異種生物由来の DNA 試料から、これと相同性の高い DNA を単離して、該 DNA から GPR<sub>v</sub> 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることは、通常行いうことである。このように GPR<sub>v</sub> 蛋白質をコードする DNA とハイブリダイズする DNA によりコードされる

蛋白質であって、GPR<sub>v</sub> 蛋白質と機能的に同等な蛋白質もまた本発明の蛋白質に含まれる。

このような蛋白質を単離するための生物としては、ヒト以外に、例えば、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ブタ、ウシ等が挙げられるが、これらに制限されない。

GPR<sub>v</sub> 蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA を単離するためのストリンジエントなハイブリダイゼーション条件としては、通常「1xSSC、0.1% SDS、37°C」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65°C」程度の条件である。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同意を有する DNA の単離を期待しうる。但し、上記 SSC、SDS および温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離される DNA がコードする蛋白質は、通常、GPR<sub>v</sub> 蛋白質とアミノ酸配列において高い相同意を有する。高い相同意とは、少なくとも 40%以上、好ましくは 60%以上、さらに好ましくは 80%以上（例えば、90%以上や 95%以上）の配列の相同意を指す。

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST(Proc. Natl. Acad. Sei. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTN や BLASTX と呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLAST に基づいて BLASTN によって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 100、wordlength = 12 とする。また、BLAST に基づいて

- 1 0 -

BLASTX によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50、wordlength = 3 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.>)。

また、遺伝子增幅技術 (PCR) (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4) を用いて GPR<sub>v</sub> 蛋白質をコードする DNA 配列 (配列番号 : 5 から 8、22 から 26) の一部を基にプライマーを設計し、GPR<sub>v</sub> 蛋白質をコードする DNA 配列と相同性の高い DNA 断片を単離し、該 DNA を基に GPR<sub>v</sub> 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることも可能である。

本発明は、また、本発明の蛋白質の部分ペプチドを含む。この部分ペプチドには、リガンドに結合するがシグナル伝達を行なわないペプチドが含まれる。このようなペプチドを基に作製したアフィニティーカラムは、リガンドのスクリーニングに好適に用いることができる。また、本発明の蛋白質の部分ペプチドは、抗体作製に用いることも可能である。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。本発明の部分ペプチドは、通常、8 アミノ酸残基以上、好ましくは 12 アミノ酸残基以上 (例えば、15 アミノ酸残基以上) である。

本発明の蛋白質は、組換え蛋白質として、また天然の蛋白質として調製することができる。組換え蛋白質は、例えば、後述するように本発明の蛋白質をコードする DNA を挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現した蛋白質を精製することにより調製することができる。一方、天然の蛋白質は、例えば、後述する本発明の蛋白質に対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる (*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Sectio

- 1 1 -

n 16.1-16.19)。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、インビトロトランスレーション（例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. Dasso, M.C., Jackson, R.J. (1989) *NA R* 17:3129-3144」参照）などにより本発明の蛋白質を調製することも可能である。

また、本発明は、上記本発明の蛋白質をコードする DNA を提供する。本発明の DNA としては、本発明の蛋白質をコードしうるものであれば、その形態に特に制限はなく、cDNA の他、ゲノム DNA、化学合成 DNA なども含まれる。また、本発明の蛋白質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有する DNA が含まれる。本発明の DNA は、上記のように、GPRv 蛋白質をコードする DNA 配列（配列番号：5 から 8、22 から 26）あるいはその一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法やこれら DNA 配列をもとに合成したプライマーを用いた PCR 法等の常法により単離することが可能である。

また、本発明は、本発明の DNA が挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターとしては、挿入した DNA を安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしては pBluescript ベクター (Stratagene 社製) などが好ましい。本発明の蛋白質を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内で蛋白質を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であれば pBEST ベクター (プロメガ社製)、大腸菌であれば pET ベクター (Invitrogen 社製)、培養細胞であれば pME18S-FL3 ベクター (GenBank Accession No. AB009864)、生物個体であれば pME18S ベクター (*Mol Cell Biol.* 8:466-472(1988)) などが好ましい。ベクターへの本発明の DNA の挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる (*Current*

- 1 2 -

*protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

また、本発明は、本発明のDNAまたは本発明のベクターを保持する形質転換体を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。蛋白質を高発現させるための真核細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞などを例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL社製)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

また、本発明は、本発明の蛋白質をコードするDNA(配列番号: 5から8、22から26のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖)に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T(ただしRNAの場合はU)、G:Cの塩基対からなる2本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなヌクレオチドは、本発明のDNAを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のDNAを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp~100bp、好ましくは15bp~35bpの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のDNAの少なくとも一部若しくは全部の配列を含む少なくとも15bpの鎖長のヌクレオチドが用いられる。このようなヌクレオチドは、好ましくは本発明の蛋白質をコードする

- 1 3 -

DNA に特異的にハイブリダイズするものである。「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジエントな条件下で、本発明の蛋白質をコードする DNA (配列番号：5 から 8、22 から 26) とハイブリダイズし、他の蛋白質をコードする DNA とはハイブリダイズしないことを意味する。

これらヌクレオチドは、本発明の蛋白質の異常を検査・診断するために利用できる。例えば、これらヌクレオチドをプローブやプライマーとして用いたノーザンハイブリダイゼーションや RT-PCR により、本発明の蛋白質をコードする DNA の発現異常を検査することができる。これらヌクレオチドは、例えば、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の検査への利用が考えられる。また、これらヌクレオチドをプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により本発明の蛋白質をコードする DNA やその発現制御領域を増幅し、RFLP 解析、SSCP、シーケンシング等の方法により、DNA 配列の異常を検査・診断することができる。

また、これらヌクレオチドには、本発明の蛋白質の発現を抑制するためのアンチセンス DNA が含まれる。アンチセンス DNA は、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも 15bp 以上、好ましくは 100bp、さらに好ましくは 500bp 以上の鎖長を有し、通常、3000bp 以内、好ましくは 2000bp 以内の鎖長を有する。このようなアンチセンス DNA には、本発明の蛋白質の異常（機能異常や発現異常）などに起因した疾患の遺伝子治療への応用も考えられる。該アンチセンス DNA は、例えば、本発明の蛋白質をコードする DNA (例えば、配列番号：5 から 8、22 から 26) の配列情報を基にホスホロチオエート法 (Stein, 1988 *Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res* 16, 3209-21 (1988)) などにより調製することが可能である。

本発明のヌクレオチドは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウ

- 14 -

イルスペクターやリポソームなどの非ウイルスペクターなどを利用して、*ex vivo* 法や *in vivo* 法などにより患者へ投与を行うことが考えられる。

また、本発明は、本発明の蛋白質に結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部も含まれる。また、全てのクラスの抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊抗体も含まれる。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体の場合には、常法に従い本発明の蛋白質のアミノ酸配列に相当するオリゴペプチドを合成し、家兎に免疫することにより得ることが可能である (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.12-11.13)。

モノクローナル抗体の場合には、常法に従い大腸菌で発現し精製した蛋白質を用いてマウスを免疫し、その脾臓細胞と骨髄腫細胞を細胞融合させたハイブリドーマ細胞を調製し、該ハイブリドーマ細胞から得ることができる (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

本発明の蛋白質に結合する抗体は、本発明の蛋白質の精製に加え、例えば、本発明の蛋白質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞などから蛋白質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA 等の方法による本発明の蛋白質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。本発明の抗体は、例えば、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の検査への利用が考えられる。

また、本発明の蛋白質に結合する抗体を、本発明の蛋白質に関連した疾患の治療などの目的に利用することも考えられる。本発明の抗体は、本発明の蛋白質のアゴニストやアンタゴニストとして作用し得る。抗体を患者の治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。ヒト抗体は、免疫系をヒトのものと入れ換えたマウス (例えば、「Functional transp

- 15 -

lant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice, Mendez, M.J. et al.(1997) *Nat. Genet.* 15:146-156」参考)に免疫することにより調製することができる。また、ヒト化抗体は、モノクローナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組換えによって調製することができる(*Methods in Enzymology* 203, 99-121(1991))。

また、本発明は、本発明の蛋白質を利用した、本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 本発明の蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、(b) 該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程を含む。

被検試料としては、特に制限はなく、例えば、種々のG蛋白質共役型受容体のリガンド活性については不明の公知化合物やペプチド(例えば、ケミカルファイアルに登録されているもの)あるいはファージ・ディスプレイ法(*J. Mol. Biol.* (1991) 222, 301-310)などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。その他、脳をはじめとする生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物などが挙げられるが、これらに制限されない。

スクリーニングに用いる本発明の蛋白質は、例えば、細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、アフィニティーカラムに結合した形態であってもよい。

具体的なスクリーニングの手法としては、例えば、本発明の蛋白質のアフィニティーカラムに被検試料を接触させ本発明の蛋白質に結合する化合物を精製する方法、ウエストウエスタンブロッティング法など多くの公知の方法を利用することができる。これら方法を利用する場合には、被検試料は適宜標識し、この標識を利用して本発明の蛋白質との結合を検出することができる。また、これら方法の他に、本発明の蛋白質を発現する細胞膜を調製して、これをチップ上に固定し

- 1 6 -

、リガンド結合時に三量体型 GTP 結合蛋白質が解離する事を、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance) の変化で検出する方法 (*Nature Biotechnology* (99) 17:1105) を用いることも可能である。

また、被検試料と本発明の蛋白質との結合活性は、被検試料が細胞表面に発現させた本発明の蛋白質へ結合することにより生じる細胞における変化を指標に検出することもできる。このような変化としては、例えば、細胞内の  $Ca^{2+}$  レベルの変化や cAMP レベルの変化が挙げられるが、これらに制限はない。具体的には、G 蛋白質共役型受容体に対するアゴニスト活性は GTP $\gamma$ S 結合法により測定できる。

この方法の 1 つの実施例として、G 蛋白質共役型受容体を発現させた細胞膜を 20mM HEPES (pH7.4), 100mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M GDP 溶液中で、<sup>35</sup>S で標識された GTP $\gamma$ S 400pM と混合させ、被検試料存在下と非存在下でインキュベーション後、濾過 (filtration) を行い、結合した GTP $\gamma$ S の放射活性を比較する手法を用いることができる。

また G 蛋白質共役型受容体は、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達するシステムを共有している。三量体型 GTP 結合蛋白質は、活性化する細胞内伝達系の種類によって、 $Ca^{2+}$  を上昇させる Gq 型、cAMP を上昇させる Gs 型、そして cAMP を抑制する Gi 型の 3 種類に分類される。このことを応用して Gq 蛋白 $\alpha$ サブユニットと他の G 蛋白 $\alpha$ サブユニットとをキメラ化し、あるいは promiscuous な G $\alpha$ 蛋白質、G $\alpha$ 15、G $\alpha$ 16 を用いてリガンドスクリーニングの際の陽性シグナルを Gq の細胞内伝達経路である、 $Ca^{2+}$  上昇に帰結させることができる。上昇した  $Ca^{2+}$  レベルは、TRE (TPA responsive element) または MRE (multiple responsive element) を上流に有するレポーター遺伝子系、Fura-2、Fluo-3 などの染色指示薬そして蛍光蛋白 aequorin などの変化を指標として検出ができる。同様に、Gs 蛋白 $\alpha$ サブユニットと他の G 蛋白 $\alpha$ サブユニットとをキメラ化し、陽性シグナルを Gs の細胞内伝達経路である、cAMP

- 17 -

上昇に帰結させ、CRE(cAMP-responsive element)を上流に有するレポーター遺伝子系での変化を指標とすることも可能である (*Trends Pharmacol. Sci.* (99) 20:118)。

このスクリーニング系において本発明の蛋白質を発現させる宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられるが、例えば、COS 細胞、CHO 細胞、HEK293 細胞などを例示することができる。本発明の蛋白質を脊椎動物細胞で発現させるためのベクターとしては、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列や複製起点等を有するものを好適に用いることができる。例えば、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (*Mol. Cell. Biol.* (1981) 1,854-864) や、pEF-BOS (*Nucleic Acids Res.* (1990) 18, 5322)、pCDM8 (*Nature* (1987) 329, 840-842)、pCEP4 (Invitrogen 社) などは、G 蛋白質共役型受容体を発現させるのに有用なベクターである。ベクターへの本発明の DNA の挿入は常法により制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11)。また、宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL 社製)、Fu GENE6 試薬 (ペーリンガーマンハイム社)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

上記の本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法により、リガンドが単離されれば、本発明の蛋白質とリガンドの相互作用を阻害する化合物のスクリーニングが可能となる。従って、本発明は、また、本発明の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 被検試料の存在下で本発明の蛋白質また

- 1 8 -

はその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、(b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程(a)で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む。

被検試料としては、特に制限はなく、例えば、コンビナトリアル・ケミストリ一技術 (Tetrahedron (1995) 51, 8135-8137) によって得られた化合物群、あるいはファージ・ディスプレイ法 (J.Mol.Biol. (1991) 222, 301-310) などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。その他、脳をはじめとする生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限はない。

スクリーニングに用いる本発明の蛋白質は、例えば、細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、あるいはアフィニティーカラムに結合した形態であってもよい。

具体的なスクリーニングの手法としては、例えば、リガンドを放射性同位元素などで標識して、被検試料の存在下において本発明の蛋白質と接触させ、被検試料非存在下で検出した場合と比較して、本発明の蛋白質とリガンドとの結合活性を低下させる化合物を、該リガンドに付された標識を基に検出する方法を用いることができる。また、上記の本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同様に、細胞内の変化を指標にスクリーニングすることも可能である。即ち、本発明の蛋白質を発現する細胞に被検試料の存在下でリガンドを接触させ、被検試料非存在下で検出した場合と比較して、該細胞における変化を減少させる化合物を選択することにより、本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物をスクリーニングすることが可能である。本発明の蛋白質を発現する細胞は、上記した本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同

- 1 9 -

様に調製することができる。このスクリーニングにより単離される化合物は、本発明の蛋白質のアゴニストやアンタゴニストの候補となる。

また、本発明は、本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 被検試料の存在下で本発明の蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、(b) 該リガンドの本発明の蛋白質への結合による細胞における変化を検出する工程、(c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程(b)で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む。

被検試料としては、上記の本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物のスリーニング方法と同様に、コンピナトリアル・ケミストリー技術によって得られた化合物群、ファージ・ディスプレイ法などを応用して作成されたランダム・ペプチド群、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分、生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などを用いることができる。また、上記の本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物のスリーニングにより単離された化合物を被検試料として用いることも可能である。本発明の蛋白質を発現する細胞は、上記した本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同様に調製することができる。被検試料接触後の細胞における変化は、上記のスクリーニング方法と同様に、細胞内の  $Ca^{2+}$  レベルや cAMP レベルの変化を指標に検出することができる。また、細胞内のシグナル伝達を検出する場合には、ルシフェラーゼなどをレポーター遺伝子とするレポーターアッセイ系等の測定系を利用して検出することも可能である。

この検出の結果、被検試料非存在下においてリガンドを接触させた場合の細胞における変化と比較して、被検試料を接触させた場合における細胞における変化が抑制されていれば、用いた被検試料は、本発明の蛋白質の活性を阻害する化合

- 2 0 -

物であると判定される。逆に、被検試料が該細胞における変化を増強させれば、該化合物は、本発明の蛋白質の活性を促進する化合物であると判定される。なお、ここでいう「本発明の蛋白質の活性の促進または阻害する」とは、本発明の蛋白質に対する直接的な作用であると、間接的な作用であるとを問わず、結果として本発明の蛋白質の活性が促進または阻害されることを指す。従って、このスクリーニングにより単離される化合物には、本発明の蛋白質またはリガンドに作用してこれらの結合を阻害または促進することにより本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物の他、これらの結合自体を阻害または促進しないが、結果として本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物も含まれる。このような化合物には、例えば、本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害しないが、細胞内のシグナル伝達経路を阻害若しくは促進する化合物が含まれる。

本発明のスクリーニング方法により単離される化合物を医薬品として用いる場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容しうる担体（賦形剤、結合剤、崩壊剤、矯味剤、矯臭剤、乳化剤、希釈剤、溶解補助剤等）と混合して得られる医薬組成物または錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、トローチ剤、シロップ剤、液剤、乳剤、懸濁剤、注射剤（液剤、懸濁剤等）、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、点眼剤、眼軟膏等の製剤として経口または非経口に適した形態で処方される。患者への投与は、一般的には、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。本発明のスクリーニング方法により単離される化合物は、例えば、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の治療への応用が期待される。

- 2 1 -

本発明は、また、本発明の GPRv 蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出することを特徴とする、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の診断方法を提供する。

本実施例において、本発明の GPRv 蛋白質をコードする遺伝子が、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病に関連した患部組織において、正常組織と比較して有意に発現レベルが相違することが見出された。従って、被検者のこれら組織における、本発明の GPRv 蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出することにより、これら疾患の診断を行うことが可能である。ここで「遺伝子の発現」には、転写および翻訳の双方が含まれる。

本発明の診断方法は、例えば、以下の如く実施することができる。

生検により採取した組織に一部や血液サンプルなどから、常法により RNA を抽出し、実施例で示した定量的 PCR、ノーザンハイブリダイゼイション、あるいはドットプロットハイブリダイゼイションなどにより GPRv mRNA の定量を行い、診断することが可能である。また、上記組織から蛋白質を抽出し、ウェスタンプロットティング、免疫沈降、ELISA 等の方法を用いた GPRv 蛋白質の定量、あるいは、非侵襲な方法として、GPRv 蛋白質に結合する化合物や抗体を標識したものを被検患者に投与し、PET (ポジトロンエミッショントモグラフィー) などで検出により診断することも可能である。

この診断の結果、被検者由来の組織における遺伝子の発現が、上記疾患に罹患した患者由来の組織における遺伝子の発現と、同一の傾向（例えば、正常組織と比較した遺伝子の発現レベルの上昇または低下）を示せば、該被検者は、疾患に罹患している、または罹患のおそれがあると判定される。

例えば、GPRv8 は結腸で発現が認められるが、結腸癌でこの発現は顕著に上昇する。従って、被検者の結腸組織において、高レベルの GPRv8 の発現が認められた場合、この被検者は、結腸癌の疑いがある。また、正常の脾臓および子宮で発現が検出できなかったが、癌化で中程度発現した。従って、被検者の脾臓また

- 2 2 -

は子宮において、GPRv8 の発現が認められた場合、この被検者は脾臓癌または子宮癌の疑いがある。

GPRv12 は正常卵巣および精巣では発現が検出できなかったが、癌化で発現が検出できた。また、アルツハイマー病では海馬での発現が減少した。従って、被検者の卵巣または精巣において、GPRv12 の発現が認められた場合、この被検者は、卵巣癌または精巣癌の疑いがある。同様に、被検者の海馬において、正常値より低レベルの GPRv12 の発現が認められた場合、この被検者は、アルツハイマー病の疑いがある。

GPRv16 は、結腸で発現しているが、癌化で発現が検出できなくなった。脳では癌化で発現が増加した。肝臓では肝硬変により発現が検出できなくなった。アルツハイマー病の脳では海馬で発現が増強した。従って、被検者の結腸において正常値より低レベルの GPRv16 の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌の疑いがある。また、脳において、正常値より高レベルの GPRv16 の発現が認められた場合、この被検者は脳の癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルの GPRv16 の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。また、海馬において正常値より高レベルの GPRv16 の発現が認められた場合、この被検者はアルツハイマー病の疑いがある。

GPRv21 は、癌化により結腸及び精巣での発現が検出できなくなった。従って、被検者の結腸または精巣において正常値より低レベルの GPRv21 の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌または精巣癌の疑いがある。

GPRv40 は、癌化により脳、精巣での発現が増加し、肝硬変により発現が減少した。従って、脳や精巣において正常値より高レベルの GPRv40 の発現が認められた場合、この被検者は脳の癌や精巣癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルの GPRv40 の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。

- 2 3 -

GPRv47 は、癌化により脳、腎臓での発現が増加し、精巣での発現が減少した。肝臓での発現が肝硬変で検出できなくなった。従って、脳や腎臓において正常値より高レベルの GPRv47 の発現が認められた場合、この被検者は脳の癌または腎臓癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルの GPRv47 の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。

GPRv51 は、結腸や精巣において癌化により発現が減少した。肝硬変の肝臓でも正常と比較して発現が減少した。アルツハイマー病において海馬で発現が増大した。従って、結腸や精巣において正常値より低レベルの GPRv51 の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌または精巣癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルの GPRv51 の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。また、海馬において正常値より高レベルの GPRv51 の発現が認められた場合、この被検者はアルツハイマー病の疑いがある。

GPRv71 は、癌化により結腸および腎臓での発現が減少し、肝硬変の肝臓では発現が検出できなくなった。アルツハイマー病では前頭葉での発現が減少した。従って、結腸または腎臓において正常値より低レベルの GPRv71 の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌または腎臓癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルの GPRv71 の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。また、前頭葉において正常値より低レベルの GPRv の発現が認められた場合、この被検者はアルツハイマー病の疑いがある。

GPRv72 は、結腸では強く発現しているが癌化で発現が検出できなくなった。アルツハイマー病の海馬で発現が増大した。従って、結腸において正常値より低レベルの GPRv72 の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌の疑いがある。また、海馬において正常値より高レベルの GPRv72 の発現が認められた場合、この被検者はアルツハイマー病の疑いがある。

また、本発明の GPRv 蛋白質をコードする遺伝子の変異により、上記疾患が発症することも考えられる。従って、本発明の GPRv 蛋白質をコードする遺伝子の

- 2 4 -

変異を検出することにより、上記疾患の診断を行なうことも可能であると考えられる。

このような遺伝子診断は、例えば、以下の如く実施することができる。

診断用の核酸はゲノム DNA または cDNA を直接にあるいは PCR もしくはその他 の增幅法を用いて増幅してもよい。正常遺伝子との比較において、増幅生成物の サイズ変化により欠失および挿入を検出することができる。増幅 DNA と GPRv を コードする DNA をハイブリダイズさせ融解温度の差などにより点突然変異を同 定することができる。DNA 配列の相違は、変性物質含有または不含のゲル中の D NA フラグメントの電気泳動の移動度の変化を検出することや、直接的な DNA 塩 基配列決定により検出できる。

この診断の結果、被検者における GPRv 蛋白質をコードする遺伝子が正常型と 比較して変異していた場合、該被検者は上記疾患の疑いがあると判定される。

即ち、本明細書記載の方法により GPRv 蛋白質をコードする遺伝子の変異、mR NA や蛋白質の発現の増加や減少を検出することにより、癌、肝硬変、またはア ルツハイマー病の診断方法またはかかる疾患に対する感受性の診断方法が提供さ れる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、「GPRv8」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対 する BLAST 検索を行った結果を示す図である。HUMAN VASOPRESSIN V1B RECEPTO R に対し 36% の相同性を示した。

図 2 は、「GPRv12」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対 する BLAST 検索を行った結果を示す図である。RAT 5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR に対し 27% の相同性を示した。

- 2 5 -

図3は、「GPRv16」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。MOUSE GALANIN RECEPTOR TYPE 1に対し28%の相同性を示した。

図4は、「GPRv21」のアミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。BOVIN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2に対して30%の相同性を示した。

図5は、「GPRv40」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。OXYTOCIN RECEPTOR (P97926)に対して34%の相同性を示した。

図6は、「GPRv47」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。GPRX\_ORYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (Q91178)に対して43%の相同性を示した。

図7は、「GPRv51」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RTA (P23749)に対して37%の相同性を示した。

図8は、「GPRv71」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。P2Y PURINOCEPTOR 3 (P2Y3) (Q98907)に対して45%の相同性を示した。

図9は、「GPRv72」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT全配列に対するBLAST検索を行った結果を示す図である。ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (Q02824)に対して30%の相同性を示した。

図10は、GPRv8のハイドロバシープロットを示す図である。

図11は、GPRv8と類似ファミリーとのアライメントを示す図である。

'\*'はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':'はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA},{NEQK},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}

- 2 6 -

'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA}, {ATV}, {SAG}, {STNK}, {STPA}, {SGND}, {SNDEQK}, {NDEQHK}, {NEQHRK}

図12は、図11の続きである。

図13は、GPRv12のハイドロバシープロットを示す図である。

図14は、GPRv12とAF208288のアラインメントを示す図である。

'\*' はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA}, {NEQK}, {NHQK}, {NDBQ}, {QHRK}, {MILV}, {MILF}, {HY}, {FYW}

'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA}, {ATV}, {SAG}, {STNK}, {STPA}, {SGND}, {SNDEQK}, {NDEQHK}, {NEQHRK}

図15は、GPRv16のハイドロバシープロットを示す図である。

図16は、GPRv16のHMMPFAM、膜貫通領域およびS-S結合についてまとめた図である。

\*\*\*はHMMPFAMの結果7tm\_1とアサインされた領域を示す。

###は膜貫通領域を示す。

@はS-S結合を形成するCysを示す。

図17は、GPRv21のハイドロバシープロットを示す図である。

図18は、GPRv21とその類似タンパクのアラインメントを示す図である。

'\*' はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA}, {NEQK}, {NHQK}, {NDBQ}, {QHRK}, {MILV}, {MILF}, {HY}, {FYW}

'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA}, {ATV}, {SAG}, {STNK}, {STPA}, {SGND}, {SNDEQK}, {NDEQHK}, {NEQHRK}

- 27 -

図19は、図18の続きである。

図20は、GPRv40のハイドロバシープロットを示す図である。

図21は、GPRv40のHMMPFAM、膜貫通領域およびS-S結合についてまとめた図である。

\*\*\*はHMMPFAMの結果7tm\_1とアサインされた領域を示す。

###は膜貫通領域を示す。

@はS-S結合を形成するCysを示す。

図22は、GPRv47のハイドロバシープロットを示す図である。

図23は、GPRv47とその類似タンパクのアライメントを示す図である。

'\*'はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':'はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。<{STA}, {NEQK}, {NHQK}, {NDBQ}, {QHRK}, {MILV}, {MILF}, {HY}, {FYW}

'.'はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。<{CSA}, {ATV}, {SAG}, {STNK}, {STPA}, {SGND}, {SNDEQK}, {NDEQHK}, {NEQHRK}

図24は、図23の続きである。

図25は、図24の続きである。

図26は、GPRv51のハイドロバシープロットを示す図である。

図27は、GPRv51と類似タンパクとのアライメントを示す図である。

'\*'はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':'はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。<{STA}, {NEQK}, {NHQK}, {NDBQ}, {QHRK}, {MILV}, {MILF}, {HY}, {FYW}

'.'はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。<{CSA}, {ATV}, {SAG}, {STNK}, {STPA}, {SGND}, {SNDEQK}, {NDEQHK}, {NEQHRK}

図28は、GPRv71のハイドロバシープロットを示す図である。

- 2 8 -

図29は、GPRv71とその類似タンパクのアラインメントを示す図である。

'\*' はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA}, {NEQK}, {NHQK}, {NDBQ}, {QHRK}, {MILV}, {MILF}, {HY}, {FYW}

'..' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA}, {ATV}, {SAG}, {STNK}, {STPA}, {SGND}, {SNDEQK}, {NDEQHK}, {NEQHRK}

図30は、図29の続きである。

図31は、GPRv72のハイドロバシープロットを示す図である。

図32は、GPRv72とその類似タンパクのアラインメントを示す図である。

'\*' はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA}, {NEQK}, {NHQK}, {NDBQ}, {QHRK}, {MILV}, {MILF}, {HY}, {FYW}

'..' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA}, {ATV}, {SAG}, {STNK}, {STPA}, {SGND}, {SNDEQK}, {NDEQHK}, {NEQHRK}

図33は、図32の続きである。

図34は、図33の続きである。

#### 発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法 (Maniatis, T. et al. (1982): "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) に従って実施可能である。

[実施例1] 新規G蛋白質共役型受容体をコードする遺伝子の単離

- 2 9 -

本発明の新規 G 蛋白質共役型受容体 (GPRv8, GPRv12, GPRv16, GPRv21, GPRv40, GPRv47, GPRv51, GPRv71, GPRv72) をコードする全長 cDNA は、PCR により取得した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv8 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGCCAGC CAACTCACAGAGGGCAGCT-3' (配列番号 : 9) 、リバースプライマーとして 5'-CTA GATGAATTCTGGCTTGGACAGAAC-3' (配列番号 : 10) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94°C (2.5 分) の後、94°C (30 秒) / 60°C (30 秒) / 72°C (1 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.1 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号 : 5 に示す。

同配列は 1116 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号 : 5 の第 1 番目から第 1116 番目) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (371 アミノ酸) を配列番号 : 1 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv12 の増幅にはヒト胎児脳由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGG CCCCCGGCGAGGCGCTGCTGGCGG-3' (配列番号 : 11) 、リバースプライマーとして 5'-TCAGTGTGTCTGCTGCAGGCAGGAATCA-3' (配列番号 : 12) を用いた。PCR は Pyro best DNA polymerase (宝酒造) を用い 5% ホルムアミド存在下で、94°C (2.5 分) の後、94°C (5 秒) / 72°C (4 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 70°C (4 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 68°C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返

- 3 0 -

した。その結果、約 1.1 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列は、ジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：6 に示す。

同配列は 1092 塩基のオープンリーディングフレーム（配列番号：6 の第 1 番目から第 1092 番目）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（363 アミノ酸）を配列番号：2 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv16 の増幅にはヒト脳由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGCTGGCA GCTGCCTTGCAGACTCTAAC-3' (配列番号：13) 、リバースプライマーとして 5'-CTATTTAACACCTTCCCCGTCTCTTGATC-3' (配列番号：14) を用いた。PCR は Pyro best DNA polymerase (宝酒造社) を用い、94°C (2 分) の後、94°C (30 秒) / 60°C (30 秒) / 72°C (1 分) のサイクルを 30 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：7 に示す。

同配列は 1260 塩基のオープンリーディングフレーム（配列番号：7 の第 1 番目から第 1260 番目）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（419 アミノ酸）を配列番号：3 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

- 3 1 -

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv21 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGAGA CCACCATGGGGTTCATGGATG-3' (配列番号: 15) 、リバースプライマーとして 5'- TTATTTAGTCTGATGCAGTCCACCTCTTC-3' (配列番号: 16) を用いた。PCR は Pyro best DNA polymerase (宝酒造) を用い、5% ホルムアミド存在下で、94°C (2.5 分) の後、94°C (5 秒) / 72°C (4 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 70°C (4 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 68°C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシタミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 8 に示す。

同配列は 1182 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 8) を持つている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (393 アミノ酸) を配列番号: 4 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv40 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGAGG ATCTCTTAGCCCCCTCAATTG-3' (配列番号: 27) 、リバースプライマーとして 5'-CTAGAAGGCACTTCGCAGGAGCAAGGC-3' (配列番号: 28) を用いた。PCR は Pyro best DNA polymerase (宝酒造) を用い、5% ホルムアミド存在下で、98°C (2.5 分) の後、98°C (5 秒) / 72°C (4 分) のサイクルを 5 回、98°C (5 秒) / 70°C (4 分) のサイクルを 5 回、98°C (5 秒) / 68°C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.3 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR 2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシタミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied

- 3 2 -

Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 2 2 に示す。

同配列は 1305 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 2 2) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (434 アミノ酸) を配列番号: 1 7 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv47 の増幅にはヒト胎児脳由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGA GTCCTCACCCATCCCCAGTCATC-3' (配列番号: 2 9) 、リバースプライマーとして 5'-TCATGACTCCAGCCGGGTGAGGCAGGCAG-3' (配列番号: 3 0) を用いた。PCR は Py robust DNA polymerase (宝酒造) を用い、5% ホルムアミド存在下で、94° C (2 分) の後、94° C (30 秒) / 50° C (30 秒) / 72° C (1.5 分) のサイクルを 35 回繰り返した。その結果、約 1.4 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR 2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジテオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 2 3 に示す。

同配列は 1356 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 2 3) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (451 アミノ酸) を配列番号: 1 8 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv51 の増幅にはヒト精巣由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGAACC AGACTTTGAATAGCAGTGG-3' (配列番号: 3 1) 、リバースプライマーとして 5'-TC

- 3 3 -

AAGCCCCATCTCATTGGTGCCCACG-3' (配列番号 : 3 2) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、98° C (2.5 分) の後、98° C (30 秒) / 50° C (30 秒) / 68° C (4 分) のサイクルを 35 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号 : 2 4 に示す。

同配列は 966 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号 : 2 4) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (321 アミノ酸) を配列番号 : 1 9 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv71 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鑄型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGAGA AGGTGGACATGAATACTCAC-3' (配列番号 : 3 3) 、リバースプライマーとして 5'-TTACCCAGATCTGTTCAACCCCTGGGCATC-3' (配列番号 : 3 4) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94° C (2.5 分) の後、98° C (5 秒) / 72° C (4 分) のサイクルを 5 回、98° C (5 秒) / 70° C (4 分) のサイクルを 5 回、98° C (5 秒) / 68° C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号 : 2 5 示す。

同配列は 1002 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号 : 2 5) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (333 アミノ酸) を配列番号 : 2 0 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体

- 3 4 -

の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv72 の増幅にはヒトゲノム DNA (Clontech 社) を鋳型 DNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGACGTCCACCTGCACCAACAGCACG C-3' (配列番号 : 35) 、リバースプライマーとして 5'-TCAAGGAAAAGTAGCAGAAT CGTAGGAAG-3' (配列番号 : 36) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94° C (2 分) の後、94° C (30 秒) / 55° C (30 秒) / 68° C (4 分) のサイクルを 30 回繰り返した。その結果、約 1.5 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシタミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになつた配列を配列番号 : 26 に示す。

同配列は 1527 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号 : 26) を持つている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (508 アミノ酸) を配列番号 : 21 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

【実施例 2】 新規 G 蛋白質共役型受容体のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索

「GPRv8」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 1 に示した。「GPRv8」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では HUMAN VASOPRESSIN V1 B RECEPTOR (P47901, 424aa) に対して、36%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv8」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv12」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 2 に示した。「GPRv12」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では RAT 5-HYDROXYTRYPTA

- 3 5 -

MINE 6 RECEPTOR (P31388, 436aa)に対して、27%で最も高い相同意を示した。

このことから「GPRv12」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv16」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 3 に示した。「GPRv16」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では MOUSE GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (P56479, 348aa)に対して、28%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv16」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv21」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 4 に示した。「GPRv21」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では「GPRv21」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では BOVIN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (P79113, 384aa)に対して 30%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv21」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv40」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 5 に示した。「GPRv40」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、OXYTOCIN RECEPTOR (P97926, 388aa)に対して 34%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv40」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv47」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 6 に示した。「GPRv47」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、GPRX\_ORYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (Q91178, 428aa)に対して 43%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv47」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv51」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 7 に示した。「GPRv51」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RTA (P23749, 343aa)に対して 37%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv51」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

- 3 6 -

「GPRv71」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 8 に示した。「GPRv71」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、Chicken P2Y PURINOCEPTOR 3 (P2Y3) (Q98907, 328aa)に対して 45%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv71」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv72」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 9 に示した。「GPRv72」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (002824, 466aa)に対して 30%で最も高い相同意を示した。このことから「GPRv72」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

### 【実施例 3】 発現組識解析

#### 1. 試薬

1.1 定量用 polymerase chain reaction (PCR) プライマー及び TaqMan プローブ：センスプライマー、アンチセンスプライマー、及び TaqMan プローブは PE Biosystems の遺伝子解析ソフトウェア Primer Express version 1.0 を用いて設計した。通常のプライマーはアマシャム・ファルマシア・バイオテク（東京）に、TaqMan プローブは PE Biosystems Japan に製造を依頼した。なお、TaqMan プローブは、5' 端にはリポーター色素 FAM を、3' 端にはクエンチャータムラを結合させた。プライマー及び TaqMan プローブの塩基配列を下に示す。

#### GPRv8 用合成 DNA

PCR プライマー G8.957F : CCAGGAGCGTTCTATGCCT (配列番号 : 37)

G8.1082R : TGTGATCTTGCTCCCTGCA (配列番号 : 38)

TaqMan プローブ GPRv8.987T:TCAGAACCTGCCAGCATTGAATAGTGCC (配列番号 : 39)

#### GPRv12 用合成 DNA

PCR プライマー G12.794F : ATCTGCTTGCCCCGTATGT (配列番号 : 40)

- 3 7 -

G12.903R : ACCGCCTTGCTGTAGGTCAG (配列番号 : 4 1 )

TaqMan プローブ GPRv12.834T:TCGTGCCCTTCGTACCGTGAA (配列番号 : 4 2 )

GPRv16 用合成 DNA

PCR プライマー G16.1133F : CCCAGCATCCATACCAGAAAA (配列番号 : 4 3 )

G16.1254R : CTGTGTCCCTCTCATGCCAAA (配列番号 : 4 4 )

TaqMan プローブ GPRv16.1193T: TGAGAAGGCAGAGATTCCCATCCTTCCT (配列番号 : 4 5 )

GPRv21 用合成 DNA

PCR プライマー G21.989F : TCGCCATGAGCAACAGCAT (配列番号 : 4 6 )

G21.1114R : CACTGGACTTACCGCCATTGT (配列番号 : 4 7 )

TaqMan プローブ GPRv21.1064T: AGATCATGTTGCTCCACTGGAAGGCTTCT (配列番号 : 4 8 )

GPRv40 用合成 DNA

PCR プライマー G40.16F : GGATCTCTTAGCCCCCTCAATTC (配列番号 : 4 9 )

G40.99R : AAGGTCAGGTTGAGACCCCAG (配列番号 : 5 0 )

TaqMan プローブ GPRv40.53T: AACATTCCGTGCCCATTTGCTGG (配列番号 : 5 1 )

GPRv47 用合成 DNA

PCR プライマー G47.1292F : GCTGTTGACTTTCGAATCCCA (配列番号 : 5 2 )

G47.1393R : ACGGAGGTAGCTGTCTGACATGA (配列番号 : 5 3 )

TaqMan プローブ GPRv47.1336T: TGAGTTCTGGAGCAGCAACTCACCA (配列番号 : 5 4 )

GPRv51 用合成 DNA

PCR プライマー G51.190F : GGCTTCGAATGCACAGGAA (配列番号 : 5 5 )

G51.276R : GGAAGCCATGCTGAAGAGGA (配列番号 : 5 6 )

TaqMan プローブ GPRv51.214T: TTCTGCATCTATATCCTAACCTGGCGG (配列番号 : 5 7 )

- 3 8 -

#### GPRv71 用合成 DNA

PCR プライマー G71.746F : TGGCCTCTCACCCCTCTGTTT (配列番号 : 5 8 )

G71.841R : ATCAAGAGCTGGCAGTCCTGA (配列番号 : 5 9 )

TaqMan プローブ GPRv71.775T: TCCATATCACTCGCTCCTCTACCTCACCA (配列番号 : 6 0 )

#### GPRv72 用合成 DNA

PCR プライマー G72.101F : CCAAAATGCCCATCAGCCT (配列番号 : 6 1 )

G72.190R : GCACTATGTTGCCGACGAAA (配列番号 : 6 2 )

TaqMan プローブ GPRv72.132T: CATCCGCTAACCGTGCTGGTTATCT (配列番号 : 6 3 )

### 1.2 疾患由来 cDNA

同一患者の腫瘍および正常組織由来の cDNA は、Clontech の Matched cDNA Pairs を用いた。組織は肺、胃、結腸、卵巣、前立腺、子宮、および腎臓である。

腫瘍患者および正常成人の脳、脾臓、精巣、肝硬変患者および正常成人の肝臓、ループス病患者の腎臓、アルツハイマー病 (AD) 患者および正常成人の海馬及び前頭葉に由来する cDNA は、BioChain Institute から購入して用いた。

### 1.3 定量 PCR 反応用試薬 :

TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Biosystems) を使用した。内部標準測定用として TaqMan  $\beta$ -actin Control Reagents (PE Biosystems) を用いた。

### 2. 定量 PCR 反応 :

#### 1) 鎔型 cDNA の希釈

BioChain の cDNA は水にて 50 倍希釈し、Clontech の cDNA は水にて 5 倍希釈して用いた。

#### 2) マスター ミックスの調製

以下の組成の反応溶液を調製した。

- 3 9 -

	反応容量	調製容量
2×Master Mix	12.5 $\mu$ l	1380 $\mu$ l
センスプロライマー (50 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	55.2 $\mu$ l
アンチセンスプロライマー (50 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l	55.2 $\mu$ l
TaqMan Probe (5 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	110.4 $\mu$ l
錆型 cDNA	2.5 $\mu$ l	
精製水	8 $\mu$ l	883.2 $\mu$ l
総量	25 $\mu$ l	2484 $\mu$ l

## 3 ) PCR 反応溶液の作成

マスターミックス溶液 54  $\mu$ l に錆型 cDNA を 6  $\mu$ l 加えた後、定量 PCR 装置用の PCR プレートに 25  $\mu$ l ずつ duplicate でサンプル用ウェルに分注した。Non template control 用の 2 ウェルには上記マスターミックスを 25  $\mu$ l ずつ分注した。標準曲線の作成には pCEP4 ベクターにサブクローニングした cDNA を 100pg/ $\mu$ l から始めて 1/10 ずつ 8 段階希釈したものを利用した。2)のマスターミックス 54  $\mu$ l と Standard 液 6  $\mu$ l を加えたものから、25  $\mu$ l ずつを Standard 用ウェルに分注した。即ち、Standard 用ウェルには最も高濃度のもので 250pg、低濃度で 25ag(a: atto,  $10^{-18}$ )のプラスミド DNA が入ることになる。8 連のキャップを装着した後、軽く遠心し気泡を除いた。

## 4 ) PCR 反応

プレートを定量 PCR 装置 (GeneAmp 5700 Sequence Detection System: PE Biosystems) にセットし、以下の運転プログラムで反応させた。

- ① 50°C, 2 分 : 1 サイクル
- ② 95°C, 10 分 : 1 サイクル
- ③ 95°C, 15 秒      } :      50 サイクル  
60°C, 1 分      }

## 5 ) 定量解析

- 4 0 -

GeneAmp 5700 の操作マニュアルに従い、定量解析を行い出力した。

3. 結果およびまとめ：

ヒト正常および疾患患者の臓器由来 cDNA を用いた GPCR の発現プロファイルは、アクチン遺伝子の発現量を内部標準として相対的な比を求め、2回の実験の平均を表 1 にまとめた。

- 4 1 -

表 1

	relative copy number								
	GPRv8	GPRv12	GPRv16	GPRv21	GPRv40	GPRv47	GPRv51	GPRv71	GPRv72
Brain	0	0	1	0	6	9	0	0	0
	5	2	11	0	23	76	2	5	0
Lung	0	0	1	0	11	0	1	1	1
	1	0	1	0	11	2	1	1	1
Stomach	6	0	0	0	29	0	1	1	0
	3	0	2	0	1	0	3	0	1
Pancreas	0	0	0	0	4	0	0	0	0
	45	2	0	0	23	2	3	4	1
Colon	141	0	61	11	119	50	111	44	113
	2766	0	0	0	110	21	6	2	0
Ovary	0	0	1	0	2	1	2	1	1
	0	4	0	0	21	1	3	3	0
Uterus	0	0	3	0	7	0	3	3	1
	19	0	0	0	9	1	21	8	1
Prostate	0	0	0	0	18	1	3	1	0
	6	0	0	0	9	0	8	3	0
Testis	18	0	10	5	3	22	20	2	1
	8	3	13	0	21	3	3	2	0
Kidney	9	0	0	0	29	0	27	3	5
	9	0	0	0	28	10	15	0	0
Lupus	25	0	1	0	1	0	3	1	0
	1	0	0	0	4	0	2	0	0
Liver	0	0	10	0	27	11	13	5	1
	1	0	0	0	4	0	2	0	0
Hippocampus	6	12	4	0	40	113	2	5	2
	16	1	50	3	111	63	55	12	27
Frontal lobe	3	2	8	0	16	140	3	8	1
	2	1	1	0	9	29	2	2	0

3倍以上の発現変化が再現された場合、有意と考える。<sup>1)</sup>印のある臓器由来 cDNA は BioChain から購入したものであり、印のない臓器由来 cDNA は Clontech から購入したものである。以下に、個々の遺伝子の疾患による発現変化をまとめ る。

GPRv8 は正常の脾臓および子宮では発現が検出できなかったが、癌化で中等度 発現した。結腸で強く発現するが、結腸癌でさらに強力に発現した。

GPRv12 は全体的に発現が弱かった。正常卵巣および精巣では発現が検出でき なかったが、癌化で発現が検出できた。アルツハイマー病では海馬での発現が減 少した。

GPRv16 は、結腸で発現しているが、癌化で発現が検出できなくなった。脳で は癌化で発現が増加した。肝臓では肝硬変により発現が検出できなくなった。ア ルツハイマー病脳では海馬で発現が増強した。

- 4 2 -

GPRv21 は、発現は少ないが、癌化により結腸及び精巣での発現が検出できなくなつた。

GPRv40 は、癌化により脳、精巣での発現が増加した。肝硬変により発現が減少した。

GPRv47 は、癌化により脳、腎臓での発現が増加し、精巣での発現が減少した。肝臓での発現が肝硬変で検出できなくなつた。

GPRv51 は、結腸で強く発現しているが癌化により発現が減弱した。精巣では癌化により発現が減少した。肝硬変の肝臓でも正常と比較して発現が減少した。脳では発現が弱いが、アルツハイマー病において海馬で発現が増大した。

GPRv71 は、癌化により結腸および腎臓での発現が減少した。肝硬変の肝臓では発現が検出できなくなつた。アルツハイマー病では前頭葉での発現が減少した。

GPRv72 は、結腸では強く発現しているが癌化で発現が検出できなくなつた。脳では発現が弱いが、アルツハイマー病の海馬で発現が増大した。

#### [実施例 4] バイオインフォーマティクスによる GPRv8 の解析

##### 1. GPRv8 のホモロジー検索

GPRv8 のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)である)に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表 2 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv8 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv8 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e-3 9 未満のもの) を表 2 に示す。

- 4 3 -

表 2

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AE003754	2e-68	43	gene: "CG6111" - <i>Drosophila melanogaster</i>
AF147743	7e-43	33	vasotocin VT1 receptor - <i>Gallus gallus</i>
AF184966	2e-42	33	arginine vasotocin receptor - <i>Platichthys flesus</i>
X93313	4e-42	36	mesotocin receptor - giant toad
X76321	8e-42	32	vasotocin receptor - white sucker
X87783	4e-41	33	isotocin receptor - white sucker
X64878	3e-40	32	oxytocin receptor - <i>H. sapiens</i>
U82440	7e-40	32	oxytocin receptor - <i>Macaca mulatta</i>

## 2. 膜貫通部位の予測

GPRv8 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J. Kyte and R.F. Doolittle, (1982), *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv8 は 7 個の膜貫通部位 (TM 1~TM7) を有することが判明した (図 10)。

## 3. HMMPfam 検索

GPRv8 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1 (<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv8 は、tm7\_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。

表 3 に、HMMPfam 検索の結果を示す。

- 4 4 -

表 3

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	164.2	5.1e-51	66	330	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit : 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score : この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect : この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from : 推定されたドメインの開始位置

Q to : 推定されたドメインの終了位置

Description : 推定されたドメインの説明

#### 4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw 1.7を用いてGPRv8と表 2 のタンパクのアミノ酸配列のアライメントをおこなった(図 11、12)。GPRv8は7個の膜貫通部位(### ###)を有し、GPCRに特有のSS結合を行うと考えられるCys (@をつけたCys)を有することが判明した。

#### [実施例 5] バイオインフォーマティクスによる GPRv12 の解析

##### 1. GPRv12 のホモロジー検索

GPRv12 のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)である)に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表 4 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv12 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv12 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e -15 未満のもの) を表 4 に示す。

- 45 -

表 4

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AF208288	8e-88	50	orphan G protein-coupled receptor GPR26 - <i>Rattus norvegicus</i>
L03202	2e-17	24	5-hydroxytryptamine receptor - rat
L41146	5e-17	23	5-HT6 serotonin receptor - <i>Rattus norvegicus</i>
S62043	2e-16	25	serotonin receptor 6 - rat
L41147	2e-16	24	5-HT6 serotonin receptor - <i>Homo sapiens</i>
AF134158	4e-16	23	serotonin 6 receptor - <i>Mus musculus</i>
L14856	4e-16	26	somatostatin receptor 4 - Human
Y14627	5e-16	21	Dopamine receptor - <i>Cyprinus carpio</i>
L07833	6e-16	26	somatostatin receptor 4- <i>Homo sapiens</i>
AF069547	8e-16	21	putative odorant receptor LOR4 - <i>Lampetra fluviatilis</i>

## 2. 膜貫通部位の予測

GPRv12 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J. Kyte and R.F. Doolittle, (1982), *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv12 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した (図 13)。

## 3. HMMpfam 検索

GPRv12 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1 (<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv12 は、tm7\_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 5 に HMMpfam 検索の結果を示す。

- 4 6 -

表 5

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	74.7	7.7e-23	22	294	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit：検索の結果推定されるドメインの名前。

Score：この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect：この値が0に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from：推定されたドメインの開始位置

Q to：推定されたドメインの終了位置

Description：推定されたドメインの説明

#### 4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw 1.7 を用いて GPRv12 と orphan G protein-coupled receptor GPR26 - *Rattus norvegicus* (AF208288) とのアミノ酸配列のアライメントをおこなった(図14)。GPRv12 は 7 個の膜貫通部位 (### ###) を有し、GPCR に特有の SS 結合を行うと考えられる Cys (@をつけた Cys) を有することが判明した。

#### [実施例 6] バイオインフォーマティクスによる GPRv16 の解析

##### 1. GPRv16 のホモロジー検索

GPRv16 のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) である)に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al.(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.) を用いて検索したところ、表 6 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv16 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv16 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e-18 未満のもの) を表 6 に示す。

- 47 -

表 6

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AF042784	4e-20	23	GALANIN RECEPTOR TYPE 2 - Mus musculus
U30290	4e-20	27	galanin receptor GALR1 - Rattus norvegicus
U90657	6e-20	27	GALANIN RECEPTOR TYPE 1 - mouse
AF042782	7e-20	25	galanin receptor type 2 - Homo sapiens
U94322	1e-19	24	galanin receptor type2 - Rattus norvegicus
AF077375	6e-19	23	galanin receptor type2 - Mus musculus

## 2. 膜貫通部位の予測

GPRv16 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J. Kyte and R.F. Doolittle, (1982), *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv16 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した (図 15)。

## 3. HMMpfam 検索

GPRv16 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1 (<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv16 は、tm7\_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 7 に、HMMpfam 検索の結果を示す。

- 4 8 -

表 7

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	23.8	8.3e-7	155	306	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)
7tm_1	13.3	0.0017	53	133	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit：検索の結果推定されるドメインの名前。

Score：この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect：この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from：推定されたドメインの開始位置

Q to：推定されたドメインの終了位置

Description：推定されたドメインの説明

4.

3. と 4. の結果を図 1 6 にまとめた。GPRv16 は GPCR に特徴的な S-S 結合を形成する Cys (@) を有することが判明した。

[実施例 7] バイオインフォーマティクスによる GPRv21 の解析

#### 1. GPRv21 のホモロジー検索

GPRv21 のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) である)に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表 8 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv21 は GPCR と相同性を有する、新規なクローニングであることが判明した。GPRv21 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e<sup>-35</sup> 未満のもの) を表 8 に示す。

- 4 9 -

表 8

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AL121755	0.0	89	G-protein coupled receptor - Human
AF236082	0.0	83	G-protein coupled receptor GPR73 - <i>Mus musculus</i>
M81490	9e-37	34	neuropeptide receptor - <i>D. melanogaster</i>
U50144	3e-36	30	type 2 neuropeptide Y receptor - <i>Bos taurus</i>
U42766	6e-36	29	neuropeptide y2 receptor - Human
AF037444	8e-36	28	cardioexcitatory receptor - <i>Lymnaea stagnalis</i>
D86238	8e-36	28	neuropeptideY-Y2 receptor - <i>Mus musculus</i>
U42389	8e-36	29	neuropeptide y/peptide YY receptor type 2 - human
U76254	8e-36	29	neuropeptide Y receptor type 2 - Human

## 2. 膜貫通部位の予測

GPRv21 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J. Kyte and R.F. Doolittle, (1982), *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv21 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した(図 17)。

## 3. HMMFam 検索

GPRv21 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1 (<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv21 は、tm7\_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。

表 9 に、HMMFam 検索の結果を示す。

- 5 0 -

表 9

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	188.1	1.6e-58	79	338	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit：検索の結果推定されるドメインの名前。

Score：この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect：この値が0に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from：推定されたドメインの開始位置

Q to：推定されたドメインの終了位置

Description：推定されたドメインの説明

#### 4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw 1.7 を用いて GPRv21 と表 8 のタンパクとのアミノ酸配列のアライメントをおこなった（図 18、19）。GPRv8 は 7 個の膜貫通部位（### ###）を有し、GPCR に特有の SS 結合を行うと考えられる Cys (@をつけた Cys) を有することが判明した。

#### [実施例 8] バイオインフォーマティクスによる GPRv40 の解析

##### 1. GPRv40 のホモロジー検索

GPRv40 のアミノ酸配列を既知配列（既知配列データベースとは、EMBL（Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>）、GENBANK（Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）、PIR（Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>）である）に対して解析プログラム（BLAST2.0）（Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.）を用いて検索したところ、表 10 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv40 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv40 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム（blast2.0）を用いて検索した結果（E-value が e-11 未満のもの）を表 10 に示す。

- 5 1 -

表 10

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
D86599	1e-13	23	oxytocin receptor - <i>Mus sp.</i>
U15280	4e-13	23	oxytocin receptor - <i>Rattus norvegicus</i>
X76321	1e-12	22	vasotocin receptor - white sucker
X64878	2e-12	21	oxytocin receptor - <i>H.sapiens</i>
X87783	2e-12	21	isotocin receptor - <i>C.commersoni</i>
D45400	3e-12	23	vasopressin receptor V1b - <i>rat</i>
L37112	3e-12	24	vasopressin receptor subtype 1b - <i>Homo sapiens</i>
U27322	6e-12	23	arginine-vasopressin V1b receptor - <i>Rattus norvegicus</i>
U82440	6e-12	21	oxytocin receptor - <i>Macaca mulatta</i>

## 2. 膜貫通部位の予測

GPRv40 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv40 は 7 個の膜貫通部位 (TM1～TM7) を有することが判明した (図 20)。

## 3. HMMpfam 検索

GPRv40 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1 (<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv40 は、tm7\_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。

表 11 に、HMMpfam 検索の結果を示す。

- 5 2 -

表 1 1

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	26.5	1.1e-07	228	352	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)
7tm_1	18.1	5e-05	59	181	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit：検索の結果推定されるドメインの名前。

Score：この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect：この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from：推定されたドメインの開始位置

Q to：推定されたドメインの終了位置

Description：推定されたドメインの説明

4.

3. と 4. の結果を図 2 1 にまとめた。GPRv40 は GPCR に特徴的な S-S 結合を形成する Cys (@) を有することが判明した。

[実施例 9] バイオインフォーマティクスによる GPRv47 の解析

#### 1. GPRv47 のホモロジー検索

GPRv47 のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)である)に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表 1 2 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv47 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv47 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e-11 未満のもの) を表 1 2 に示す。

- 5 3 -

表 1 2

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
D43633	1e-85	41	G protein-coupled seven-transmembrane receptor - Medaka fish
X98133	2e-28	27	histamine H2 receptor - H.sapiens
M32701	3e-28	28	histamine H2 receptor - Canine histamine
L41147	6e-28	31	5-HT6 serotonin receptor - Homo sapiens
U25440	8e-28	26	histamine H2 receptor - Cavia porcellus
D49783	1e-27	28	histamine H2 receptor - Human
U64032	2e-27	27	alpha 1d adrenoceptor - Oryctolagus cuniculus
S73473	3e-27	28	beta 3-adrenergic receptor - rats
M74716	4e-27	28	beta-adrenergic receptor - Rat
S57565	6e-27	27	histamine H2-receptor - rats

## 2. 膜貫通部位の予測

GPRv47 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv47 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した (図 2 2)。

## 3. HMMFam 検索

GPRv47 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1 (<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv47 は、tm7\_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。

表 1 3 に、HMMFam 検索の結果を示す。

- 5 4 -

表 1 3

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	137.9	9.6e-43	59	341	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit：検索の結果推定されるドメインの名前。

Score：この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect：この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from：推定されたドメインの開始位置

Q to：推定されたドメインの終了位置

Description：推定されたドメインの説明

#### 4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw 1.7を用いてGPRv47と類似タンパクとのアミノ酸配列のアライメントをおこなった（図23～25）。GPRv8は7個の膜貫通部位（### ###）を有し、GPCRに特有のSS結合を行うと考えられるCys（@をつけたCys）を有することが判明した。

#### [実施例10] バイオインフォーマティクスによるGPRv51の解析

##### 1. GPRv51のホモロジー検索

GPRv51のアミノ酸配列を既知配列（既知配列データベースとは、EMBL（Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>）、GENBANK（Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）、PIR（Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>）である）に対して解析プログラム（BLAST2.0）（Altschul, Stephen F. et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.）を用いて検索したところ、表14に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv51はGPCRと相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv51のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム（blast2.0）を用いて検索した結果（E-valueがe-18未満のもの）を表14に示す。

- 5 5 -

表 1 4

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
M35297	4e-43	36	G-protein coupled receptor - Rat
J03823	1e-42	34	Rat mas oncogene, complete cds.
M13150	3e-40	34	mas proto-oncogene - Human
X67735	1e-39	35	Mas proto-oncogene - <i>M. musculus</i> mas
AL035542	1e-35	36	MAS-related G protein-coupled receptor MRG - Human

## 2. 膜貫通部位の予測

GPRv51 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv51 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した (図 2 6)。

## 3. HMM Pfam 検索

GPRv51 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMM PFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1 (<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv51 は、tm7\_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。

表 1 5 に HMM Pfam 検索の結果を示す。

表 1 5

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	32.6	1.4e-09	44	78	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)
7tm_1	30.1	8.7e-09	104	276	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit: 検索の結果推定されるドメインの名前。

- 5 6 -

Score : この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect : この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from : 推定されたドメインの開始位置

Q to : 推定されたドメインの終了位置

Description : 推定されたドメインの説明

#### 4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw1.7を用いてGPRv51とG-protein coupled receptor - Rat(M35297)とのアミノ酸配列のアライメントをおこなった(図27)。GPRv51は7個の膜貫通部位(### ###)を有することが判明した。

[実施例11] バイオインフォーマティクスによるGPRv71の解析

#### 1. GPRv71のホモロジー検索

GPRv71のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR(Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)である)に対して解析プログラム(BLAST2.0)(Altschul, Stephen F. et al.,(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表16に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv71はGPCRと相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv71のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム(blast2.0)を用いて検索した結果(E-valueがe-35未満のもの)を表16に示す。

- 5 7 -

表 1 6

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AF069555	9e-44	44	G protein-coupled receptor p2y3 - Meleagris gallopavo
X98283	9e-44	45	P2Y PURINOCEPTOR 3 - G.domesticus
AF031897	6e-41	40	P2Y nucleotide receptor - Meleagris gallopavo
X99953	1e-39	41	P2Y PURINOCEPTOR 8 - X.laevis
D63665	2e-37	41	novel G protein-coupled P2 receptor - Rat
Y14705	1e-36	40	P2Y4 receptor gene - Rattus norvegicus
AJ277752	2e-36	41	P2Y4 receptor - Mus musculus

## 2. 膜貫通部位の予測

GPRv71 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv71 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した (図 2 8)。

## 3. HMMpfam 検索

GPRv71 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1):320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1 (<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv71 は、tm7\_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。

表 1 7 に、HMMpfam 検索の結果を示す。

- 5 8 -

表 1 7

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	90.6	7.6e-28	40	161	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit：検索の結果推定されるドメインの名前。

Score：この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect：この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from：推定されたドメインの開始位置

Q to：推定されたドメインの終了位置

Description：推定されたドメインの説明

#### 4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw1.7を用いてGPRv71とその類似タンパクとのアミノ酸配列のアライメントをおこなった（図29、30）。GPRv71は7個の膜貫通部位（### ###）を有することが判明した。

#### [実施例12] バイオインフォーマティクスによるGPRv72の解析

##### 1. GPRv72のホモジー検索

GPRv72のアミノ酸配列を既知配列（既知配列データベースとは、EMBL（Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>）、GENBANK（Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）、PIR（Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>）である）に対して解析プログラム（BLAST2.0）（Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.）を用いて検索したところ、表18に示す配列とホモジーを有することが明らかになった。GPRv72はGPCRと相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv72のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム（blast2.0）を用いて検索した結果（E-valueがe-24未満のもの）を表18に示す。

- 5 9 .

表 18

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AF091890	4e-29	32	G-protein coupled receptor RE2 - Homo sapiens
U81982	3e-25	30	alpha 1a-adrenoceptor - Oryctolagus cuniculus
S71323	6e-25	32	alpha-1A adrenergic receptor - Japanese medaka
D63859	6e-25	32	alpha1A-adrenoceptor - Oryzias latipes
U07126	8e-25	29	alpha1c adrenergic receptor - Rattus norvegicus
U03866	8e-25	30	adrenergic alpha-1c receptor protein - Human
AF013261	8e-25	30	alpha 1A adrenergic receptor isoform 4 - Homo sapiens
L31774	8e-25	30	alpha-1C-adrenergic receptor - Human
D32202	8e-25	30	alpha 1C adrenergic receptor isoform 2 - Human
D32201	8e-25	30	alpha 1C adrenergic receptor isoform 3 - Human
D25235	8e-25	30	alpha1C adrenergic receptor

## 2. 膜貫通部位の予測

GPRv72 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法 (J. Kyte and R.F. Doolittle, (1982), *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.) によりハイドロバシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv72 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した (図 31)。

## 3. HMMFam 検索

GPRv72 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMFAM (Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1 (<http://hmmer.org>)

- 6 0 -

wustl.edu/)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv72 は、7tm\_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。

表 1 9 に、HMM Pfam 検索の結果を示す。

表 1 9

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	196.1	4.7e-61	48	454	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit：検索の結果推定されるドメインの名前。

Score：この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect：この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from：推定されたドメインの開始位置

Q to：推定されたドメインの終了位置

Description：推定されたドメインの説明

#### 4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw1.7を用いてGPRv72と表 1 8 のタンパクとのアミノ酸配列のアライメントをおこなった（図 3 2 ～ 3 4）。GPRv72は 7 個の膜貫通部位（### ###）を有し、GPCRに特有のSS結合を行うと考えられるCys (@をつけたCys) を有することが判明した。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、新規 G 蛋白質共役型受容体 (GPRv8, GPRv12, GPRv16, GPRv21, GPRv40, GPRv47, GPRv51, GPRv71, GPRv72) 、該蛋白質をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該蛋白質の製造方法が提供された。さらに、該蛋白質の活性を修飾する化合物のスクリーニング方法が提供された。本発明の蛋白質やその遺伝子、または本発明の蛋白質の活性を修飾

- 6 1 -

する化合物は、本発明の G 蛋白質共役型受容体蛋白質が関与する疾患の新しい  
予防薬や治療薬の開発への利用が期待される。

- 6 2 -

### 請求の範囲

1. グアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体をコードする下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA。

(a) 配列番号：1 から 4、17 から 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA。

(b) 配列番号：5 から 8、22 から 26 のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。

(c) 配列番号：1 から 4、17 から 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA。

(d) 配列番号：5 から 8、22 から 26 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA にストリンジエントな条件下でハイブリダイズする DNA。

2. 配列番号：1 から 4、17 から 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードする DNA。

3. 請求項 1 または 2 に記載の DNA を含有するベクター。

4. 請求項 1 または 2 に記載の DNA または請求項 3 に記載のベクターを保持する形質転換体。

5. 請求項 1 または 2 に記載の DNA によりコードされる蛋白質またはペプチド。

6. 請求項 4 に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、請求項 5 に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法。

7. 請求項 5 に記載の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法であつて、

(a) 請求項 5 に記載の蛋白質またはペプチドに被検試料を接触させる工程、

- 6 3 -

(b) 該蛋白質またはペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法。

8. 請求項 5 に記載の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検試料の存在下で請求項 5 に記載の蛋白質またはその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、

(b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程 (a) で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

9. 請求項 5 に記載の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で該蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、

(b) 該リガンドの該蛋白質への結合による細胞における変化を検出する工程、

(c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程 (b) で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法。

10. 細胞における変化が、cAMP 濃度の変化またはカルシウム濃度の変化である、請求項 8 または 9 に記載の方法。

11. 請求項 5 に記載の蛋白質に結合する抗体。

12. 請求項 7 から 10 のいずれかに記載のスクリーニングにより単離される化合物。

13. 請求項 12 に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物。

14. 癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の治療のための、請求項 13 に記載の医薬組成物。

- 6 4 -

15. 配列番号：5 から 8、22 から 26 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチド。

16. 癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の診断方法であって、被検者由来の該疾患に関連した組織における請求項 1 に記載の DNA の発現、または被検者における請求項 1 に記載の DNA の変異追加しましたを検出することを含む方法。

17. 請求項 11 に記載の抗体または請求項 15 に記載のヌクレオチドを含む、癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の診断薬。

1 / 3 4

☒ 1

>sp|P47901|V1BR\_HUMAN VASOPRESSIN V1B RECEPTOR (AVPR V1B) (VASOPRESSIN V3 RECEPTOR) (AVPR V3) (ANTIDIURETIC HORMONE RECEPTOR 1B).  
Length = 424

Score = 316 (111.2 bits), Expect = 3.7e-41, Sum P(2) = 3.7e-41  
Identities = 70/194 (36%), Positives = 115/194 (59%)

Query: 56 LWLFVFTIVGNSVLFSTWRR-KKKSRTFFVTQLAITDSFTGLVNI LTDINWRFTGDF 114  
L + V GN VL + + +K+SRM FV LA+TD L +L + W T F  
Sbjct: 41 LATVLVLATGGNLAVLLTGQLGRKRSRMHLFVLHLALTDLAVALFQVLPQOLLWDITYRF 100

Query: 115 TAPDLVCRVVRYLQVVLLYASTYVLVSLSIDRYHAIYPMKFLQGEKQARVLIVIA-WSL 173  
PDL+CR V+YLQV+ ++ASTY+L++++DRY A+ +P++ LQ Q+ L++ A W L  
Sbjct: 101 QGPDLLCRAVKYLQVLSMFASTYMLLAMTLDRLAVCHPLRSLQQPGQSTYLLIAAPWLL 160

Query: 174 SFLFSIPTLIIFGKRTL--SNGEVQCWALWPDDSY-WTP--YMTIVAFLVYFIPLTIISI 228  
+ +FS+P + IF R + +G + CWA D + W P Y+T ++ +P+T+++  
Sbjct: 161 AAIFSLPQVFIFSLREVIQGSGVLDCA---DFGFPGPRAYLTWTTLAIFVLPVTMLTA 217

Query: 229 MYGIVIRTIW--IKSKT 243  
Y ++ I +K KT  
Sbjct: 218 CYSLICHEICKNLKVKT 234

Score = 131 (46.1 bits), Expect = 3.7e-41, Sum P(2) = 3.7e-41  
Identities = 33/80 (41%), Positives = 47/80 (58%)

Query: 258 SSYNRGLISKAKIKAIKYSIIILAFICCWSPYF---LFDILDNFNLLPDTQERFYASVI 314  
SS N IS+AKI+ +K + +I+LA+I CW+P+F ++ +D N PD A I  
Sbjct: 267 SSINT--ISRAKIRTVKMTFVIVLAYIACWAPFFSVQMWSVWDK-NA-PDEDSTNVAFTI 322

Query: 315 IQNLPALNSAINPLIYCVFSSI 337  
L LNS NP IY F+S +  
Sbjct: 323 SMLLGNLNSCCNPWIYMGFNSHL 345

2 / 34

図2

>sp|P31388|5H6\_RAT 5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)  
(ST-B17).  
Length = 436

Score = 224 (78.9 bits), Expect = 6.7e-17, P = 6.7e-17  
Identities = 84/309 (27%), Positives = 144/309 (46%)

Query: 3 PGEA--LLAGLLVMVLAVALLSNALVLLCCAYS AELRTRASGVLLVNLSLGHLLAALDM 60  
PG + + A L V+++ A ++ L++L C A LR S LV+L L++ + M  
Sbjct: 23 PGGSGWVAAALCVVIVLTAANSLLIVLICTQPA-LRN-TSNFFLVS LFTSDLMVGLVVM 80

Query: 61 PFTLLGVMRGRTPSAPGACQVIGFLDTFLASNAALSVAALSADQWLAVGFPLRYAGRLR- 119  
P +L + GR A G C + D S + L++ +S D++L + PLRY R+  
Sbjct: 81 PPAMLN A LYGRWVLARGLC LWTAFDVMCCSASILNLCLISLDYLLI LSPRLYKL RMTA 140

Query: 120 PRYAGLLLGC A WGQSLA FSGA ALGCSWLG YSSA FASCSLRLPPEPERPRFAA---FTATL 176  
PR L+LG AW SLA AL S+L + P P + R A F  
Sbjct: 141 PRALALI LG-AW--SLA---ALA-SFLPLLLGWH E LGKARTPAPGQCRLLASLPFVLVA 192

Query: 177 HAVGFVLPLAVLCLTS LQVH RVARRH CQRM DTVT-----MKAL ALLA DLHPSVR---- 225  
V F LP +C T ++ AR+ ++ ++T ++ L + P +  
Sbjct: 193 SGVTFFLPSGAICFTYCRILLAARKQAVQVASLTTGTAQQALETLQV PRTPRPGMESADS 252

Query: 226 QRCLIQQKRRRH R ATRKIGIAIATFLICFAPYVMTRLAE LVPFVTVNAQWGILSKCLTYS 285  
+R + R+ +A+ +G I + F + +P+ + +A+ V + +L+ L Y  
Sbjct: 253 RRLATKHSRKALKASLTGILLGMFFVTLPFFVANIAQAVCDCISPGLFDVLT-WLGYC 311

Query: 286 KAVADPFTYSLLRRPFRQVL 305  
+ +P Y L R F++ L  
Sbjct: 312 NSTMNPIIYPLFMRDFKRAL 331

3 / 34

図3

>sp|P56479|GALR\_MOUSE GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (GAL1-R) (GALR1).  
Length = 348

Score = 269 (94.7 bits), Expect = 7.9e-24, P = 7.9e-24  
Identities = 82/289 (28%), Positives = 136/289 (47%)

Query: 49 VGFVGNLCVIGILLHNAWKGKP-SMIHSLILNLSADLSLLLFSAPIRATAYSKSVDLG 107  
+G +GN VI +L + GKP S + ILNLS+ADL+ LLF P +AT Y+ W LG  
Sbjct: 46 MGVLGNLSLITVLARSK-PGKPRSTTNLFILNLSIADLAYLLFCIPFQATVYALPTWVLG 104

Query: 108 WFVCKSSDWIFIHTCMAAKSLTIVVVA--KVCFCMYASDPAKQVSIHNYTIWSVLVAIWTVA 165  
F+CK +F M T+ ++ + + S + ++ + V IW ++  
Sbjct: 105 AFICKFIHYFFTIVSMLVSIFTLAAMSVDRYVAIVHSRRSSSLRVSRNALLGVGF-IWALS 163

Query: 166 SLLPLPEWFFSTIRHHEGVE-MCLVDVPAVAEEFMSMFGKLYPL--LAFG--LPLFFASF 220  
+ P + + H + + C P + K Y + FG LPL F  
Sbjct: 164 IAMASPVAYHQRLFHRDSNQTCWEQWPN-----KLHKKAYVVCTFVFGYLLPLLLICF 217

Query: 221 YFWRAYDQCKKRGTKTQNLRNQIRSKQVTVMLLSIAIISAVLWLPEWVAWLWVWHLKAAG 280  
+ + + K+ K + +++ K+ +L + ++ + WLP V LW A  
Sbjct: 218 CYAKVLNHLHKK-LKNMSKKSEASKKTAQTVLVVVVVFGISWLPHVVHLWAEF--GAF 274

Query: 281 PAPPQGFI--ALSQVLMFSISSANPLIFLVMSEEFREGLKGWVKWMITKKPPTVSESQE 337  
P P F + L +S SS NP+I+ +SE FR+ K V+K + + P SE+E  
Sbjct: 275 PLTPASFFFRTAHCLAYSNSSVNPIIYAFLENSFRKAYKQVFKCHVCDESPR-SETKE 332

4 / 3 4

☒ 4

>sp:NY2R\_BOVIN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (NPY2-R).  
Length = 384

Score = 153 bits (383), Expect = 5e-37  
Identities = 93/308 (30%), Positives = 164/308 (53%), Gaps = 7/308 (2%)

Query: 47 DEDEDVTSRTFFAAKIVIGMALVGIMLVCGIGNFIFIAALVRYKKLRNLTNLLIANLAI 106  
D + ++ +S ++V+ +A I+L+ IGN + I +++++K +R +TN IANLA+  
Sbjct: 38 DSEPELIDSTKLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLVIHVVVKFKSMTVTNFFIANLAV 97

Query: 107 SDFLVAIVCCPFEMDYYVVRQLSWEHGHVLCTSVDVSYLRTVSLYVSTNALLAIAIDRYLAI 166  
+D LV +C PF + Y ++ + W+ G VLC V Y + +++ VST L IA+DR+ I  
Sbjct: 98 ADLLVNTLCLPFTLTYTLMGE--WKMGPVLCVLVPYAQGLAVQVSTITLTVIALDRHRCI 155

Query: 167 VHPLRPRMKCQTATGLIALVWTVSILIAIPSAYFTTETVLVIVKSQEKFICGQIWPVDQQ 226  
V+ L ++ Q + +I L W VS L+A P A F +++ I+ E + C + WP +++  
Sbjct: 156 VYHLESKISKQISFLIIGLAWGVSALLASPLAIFREYSLIEIIPDFEIVACTEKWPGEEK 215

Query: 227 -LYYKSYFLFIFGIEFVGPVVTMTCYARISRELWFKAVPGFQTEQIRKRLRCRRKTVL 285  
+Y Y L I +V P+ ++ Y RI +L PG + +R R+KT +  
Sbjct: 216 GIYGTIYSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLKNHVSPGAHDHYHQR---RQKTTKM 272

Query: 286 LMCILTAYVLCWAPFYGFTIVRDFFPFTVFVKEHYLTAFYIVECIAMSNSMINTLCFVT 345  
L+C++ ++ W P + F + D V + K Y F + IAM ++ N L + +  
Sbjct: 273 LVCVVVFAVSWLPLHAFQLAVDIDSHV-LDLKEYKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWM 331

Query: 346 KNDTVKYF 353  
++ K F  
Sbjct: 332 NSNYRKAF 339

5 / 34

図 5

>sp|P97926|OXYR\_MOUSE OXYTOCIN RECEPTOR (OT-R).  
Length = 388

Score = 164 (57.7 bits), Expect = 8.9e-22, Sum P(2) = 8.9e-22  
Identities = 57/166 (34%), Positives = 84/166 (50%)

Query: 24 WGLNLTLGQQGAP-----ASGPPSR-----RVRLVFLGVILVVAVAGNTTVLCRLCGGG 71  
W + L LG G P +GPP R RV + L +IL +A+GN VL L  
Sbjct: 9 WSIELDLGSGVPPGAEGNLTAGPPRRNEALARVEAVLCLILFLALSGNACVLLAL--- 64

Query: 72 GPWAGPKRRKMDFLVQLALADLYACGGTALSQALWELLGEPRAATGDLACRFLQQLQAS 131  
K ++ F + L++ADL L QL W++ R DL CR ++ LQ  
Sbjct: 65 -RTTRHKHSRLFFFMKHLSIADLVAVFQVLPQLLWDITF--RFYGPDLLCRLVKYLQVV 121

Query: 132 GRGASAHLVVILIALERRRAVRLPHGRPLPARA--LAALG-WLLALLLALPPAFV 182  
G AS +L++L++L+R A+ P R L R LA L WL L+ ++P +  
Sbjct: 122 GMFASTYLLLMSLDRCLAIQPL-RSLRRRTDRLAVLATWLGCLVASVPQVHI 174

Score = 155 (54.6 bits), Expect = 8.9e-22, Sum P(2) = 8.9e-22  
Identities = 49/161 (30%), Positives = 85/161 (52%)

Query: 217 CHGIFAPLPRWHLQVYAFYEAVAGFVAPVTVLGVACGHLLS--VWW--RHRPQAPAAAAP 272  
C +F + W + Y + A ++ PV VL AC L+S +W R + A AAAA  
Sbjct: 187 CWAVF--IQPWGPKAYVTWITLAVYIVPVIVLA-ACYGLISFKIWQNLRLKAAAAAAAE 243

Query: 273 WSASPG-----RAPAPSALPRAKVQSLKMSLLLALLFVGCELPYFAARLAAWS-SG 323  
S + G R + + +AK+++KM+ ++ L F+ C P+F ++ + W +  
Sbjct: 244 GSDAAGGAGRAALARVSSVKLISKAKIRTVKMTFIIVLAFIVCWTFFFFVQMWSVWDVNA 303

Query: 324 PAGDWEGEGLSAALRVVAMANSALNPFYLVFFQAGDCRLRRQLRKRLGSLCCA 376  
P E A+ ++A NS NP++Y+ F L +L +R LCC+  
Sbjct: 304 PK---EASAFIIAM-LLASLNCCNPWIYMLFTG---HLFHELVQRF--LCCS 347

6 / 34

☒ 6

>sp|Q91178|GPRX\_ORYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (FRAGMENT).  
Length = 428

Score = 823 (289.7 bits), Expect = 9.8e-83, P = 9.8e-83  
Identities = 182/422 (43%), Positives = 266/422 (63%)

Query:	2 ESSPIPQSSGNSSTLGRVPQTPGPSTASGVPEVGL---RDVASESVALFFMLLLTLAV 57 ++SP+ S + S P P+ P+VG+ + + LF M+ L+L A+
Sbjct:	5 KTSPMITSDHSISNFSTGLFGPHPTVP---PDVGVVTSQSQMKDLFGLFCMVTLNIAL 61
Query:	58 AGNAAVMAVIAKTPALRKFVFVFLCLVDLLAALTLMPLAMLSSALFDHALFGEVACRL 117 N VM IA+ P L+KF FV HLC VD+L A+ LMPL ++SSS F +F + C++
Sbjct:	62 LANTGVMVVAIARAPHLKKFAFVCHLCAVDVLCAIILMPLGIISSSPFFGTVVFTILECQV 121
Query:	118 YLFLSVCVSLAILSVSAINVERYYYYVHPMRYEVRTLGLVASVLGVVVVKALAMASVP 177 Y+FL+V + L+IL++AI+VERY+Y+VHPMRYEV+MT+ LV V++ +W K+L +A V
Sbjct:	122 YIFLNVFLIWLISILTITAIISVERYFYIVVHPMRYEVKMTINLVIGVMLLIWFKSLLLALVT 181
Query:	178 VLGRVSWEEGAPSVPVPGCSLQWSHSAYCQLFVVVFAVLYFLPLLLLILVVYCSMFRVARV 237 + G + + CSL SHS +F V+F V+ FL P++I VY +++VAR
Sbjct:	182 LFGWPPYGHQSSIAASHCSLHASHSRLRGVFAVLFCVICFLAPVVVIFSVYSAVYKVAR 241
Query:	238 AAMQHGP-LPTWME-TP-RQRSESLSSRSTMVTSQAPQT-TPHRTFGGGKAAVVLLAVG 293 AA+Q P +PTW + +P + RS+S++S++T++T+ PQ +P R F GGKAA+ L +
Sbjct:	242 AALQQPAVPTWADASPAKDRSDSINSQTTIITRTLQQLSPERAFSGGKAALTAFIV 301
Query:	294 GQFLLCWLPYFSFHLYVALSAQPISTGQVESVVTWIGYFCFTSNPFFYGCLNRQIRGELS 353 GQFL+CWLP+F FHL ++L+ S G +E V W+ Y F NP FYG LNRQIR EL
Sbjct:	302 GQFLVCWLPFFIFHLQMSLTGSMKSPGDLEEAVNWLAYSSFAVNPSFYGLLNQRQIRDELV 361
Query:	354 K-QFVCFFKPAPEEERLPREGSIEENFLQFLQGTGCPSESWSRPLPSPKQ-EPPAVD 411 K + C +P E+ S EGS +ENFLQF+Q T SE+ S +P+ E A
Sbjct:	362 KFRRCCVTQPV---EIGPSSLEGSFQENFLQFIQRTSSSSETHPSFANSNPRNMENQA-- 416
Query:	412 FRIPGQIAEE 421 +IPGQI EE
Sbjct:	417 HKIPGQIPEE 426

7 / 34

図 7

>sp|P23749|RTA\_RAT PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RTA.  
Length = 343

Score = 461 (162.3 bits), Expect = 2.3e-44, P = 2.3e-44  
Identities = 121/323 (37%), Positives = 178/323 (55%)

Query:	2 NQTLNSSGTVESALNSRGS-TVHT-AYL----VLSSLAMFTCLCGMAGNSMVIWLLGFR 55
	NQ   G E+ YSRG T+ A L   V + + + CLCG+ GN +V+W GF
Sbjct:	13 NQNKMCPGMSEALELYSRGFLTIEQIATLPPPAVTNYIFLLLCLCGLVGNGLVLWFFGFS 72
Query:	56 MHRNPFCIYILNLAAADLLFLFSMASTLSLETQPLVNT-TDKVHELMKRLMYFAYTVGLS 114
	+ R PF IY L+LA+AD ++LFS A   L   + + D V   + + + + G+S
Sbjct:	73 IKRTPFSIYFLHLASADGIYLF SKAVI ALLNMGTFLGSFPDYVRRVSRI VGLCTFFAGVS 132
Query:	115 LLTAISTQRCLSVLFPIWFKCHRPRHLSAWCGLLWTLCLLMNGLTSSFCSKFL--KFNE 172
	LL AIS +RC+SV+FP+W+ RP+ LSA VC LLW L L+ + + FC FL + +
Sbjct:	133 LLPAISIERCVSVIFPMWYWRRRKRLSAGVCALLWLLSFLVTSIHNYFCM-FLGHEASG 191
Query:	173 DRCFRVDMVQAALIMGVLTPVMTLSSLTLFVWVRRSSQQWRRQPTRLFVVVLASVLVFLI 232
	C +D+ L+ + P+M L L L + V   ++ R++ +L VVLA V VFL+
Sbjct:	192 TACLNMDISLGILLFFLFCPLMVLPCLA LILHVECRARR-RQRSAKLNHVVLAIVSVFLV 250
Query:	233 CSLPLSIYWFVLYWL-SLPPEMQVLCFSLSRLSSSVSSSANPVIYFLVGSRRSHRLPTRS 291
	S+ L I WF L+W+ +P   ++ L   ++SSA P++YFL G +S RL
Sbjct:	251 SSIYLGIDWF-LFWVFQIPAPFPEY--VTDL CICINSSAKPIVYFLAGRDKSQRL-WEP 305
Query:	292 LGTVLQQALRE--EPELEGGETPTVGTNEM 319
	L V Q+ALR+ EP   TP   T EM
Sbjct:	306 LRVVFQRALRDGAEPGDAASSTPNTVTMEM 335

8 / 3 4

図 8

>sp|Q98907|P2Y3\_CHICK P2Y PURINOCEPTOR 3 (P2Y3) (NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE RECEPTOR).  
Length = 328

Score = 452 (159.1 bits), Expect = 2.0e-43, P = 2.0e-43  
Identities = 85/185 (45%), Positives = 116/185 (62%)

Query: 15 CQFSEKYKQVYLSLAYSIIIFIQLPLNGTVLWHFWGQTKRWSCATTYLVNLMVADLLYVL 74  
C F E++KQV L L YS++F+LGLPLN V+ W K + T Y++NL +ADLLYV  
Sbjct: 13 CTFHEEFKQVLLPLVSVVFLGLPLNAVIVGQIWLARKALTRTTIYMLNLA  
MADLLYVC 72

Query: 75 -LPFLIITYSLDDRWPFGELLCKLVHFLFYINLYGSILLTCISVHQFLGVCHPLCSLPY 133  
LP LI Y+ D WPFG+ CK V F FY NL+GSIL LTCISV +++G+CHPL S  
Sbjct: 73 SLPLLIYNYTQKDYWPFGDFTCKFVRFQFYTNLHGSILFLTCISVQRYMGICHPLASWHK 132

Query: 134 RT-RRHAWLGTSTTWALVVLQLLPTLAFSHTDYINGQMIWYDMTSQENFDRLFAYGIVLT 192  
+ ++ WL + W +V+ Q LPT F+ T + + YD++ + F YGI LT  
Sbjct: 133 KKGKKLTWLVCAAWFIVIAQCLPTFVFASTGTQRNRTVCYDLSPPDRSTS  
YFPYGITLT 192

Query: 193 LSGFL 197  
++GFL  
Sbjct: 193 ITGFL 197

9 / 34

図 9

>sp|002824|A1AA\_RABIT ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR)  
 (ALPHA-1C ADRENERGIC RECEPTOR).  
 Length = 466

Score = 295 (103.8 bits), Expect = 1.0e-31, Sum P(2) = 1.0e-31  
 Identities = 66/215 (30%), Positives = 113/215 (52%)

Query: 8 STRESNSSHTCMPLSKMPISLAHGIIRSTVLVIFLAASFVGNIVLALVLQRKPQLLQVTN 67  
 S S+SS+ P+ P+++ I+ +L + +GNI++ L+ L VT+  
 Sbjct: 5 SGNASDSSNCTHPPA--PVNISKAILLGVILGGLILFGVGLGNILVILSVACHRHLHSVTH 62

Query: 68 RFIFNLLVTDLLQISLVAPVVVATSVPLFWPLNSHFCALVSLTHLFAFASVNTIVVVSV 127  
 +I NL V DLL S V P+ + +W FC ++ L AS+ ++ V+S+  
 Sbjct: 63 YYIVNLAVADLLTSTLPFSAIFEILGYWAFGRVFCNIWAADVLCCTASIISLCVISI 122

Query: 128 DRYLSIIHPLSYPSKMTQRRGYLLLGYTWIVAILQSTPPLYGWGQAAFDERNALCSMIWG 187  
 DRY+ + +PL YP+ +TQRG L W ++ S PL+GW Q A D+ +C +  
 Sbjct: 123 DRYIGVSYPLRYPTIVTQRRGLALLCVAFSLVISVGPLFGWRQPAPDDET-ICQI--N 179

Query: 188 ASPSYTILSVVSFIVIPLIVMIACYSVVFCAARRQ 222  
 P Y + S + +PL + +A Y V+ A+R+  
 Sbjct: 180 EEPGYVLFSALGSFYVPLTIILAMYCRVYVVAKRE 214

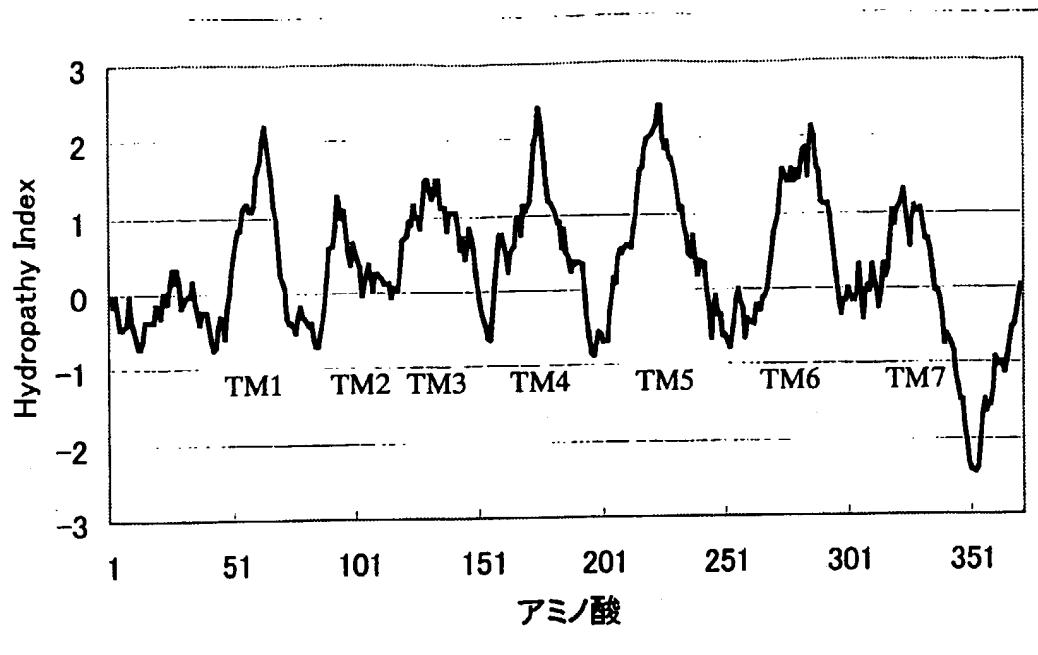
Score = 106 (37.3 bits), Expect = 1.0e-31, Sum P(2) = 1.0e-31  
 Identities = 23/75 (30%), Positives = 41/75 (54%)

Query: 396 KAAKVIFIIIFS YVLSLGPYCFLAVLAVVVDVETQVQWVITIIIWLFFLQCCIHPYVYG 455  
 KAAK + I++ +VL P+ + + + + + P+ V I+ WL +L CI+P +Y  
 Sbjct: 269 KAAKTLGIVVGCFVLCWLPFFLVMPIGSFFP-DFKPPETVFKIVFWLGYLNSCINPIIYP 327

Query: 456 YMHKTIKKEIQDMLK 470  
 + KK Q++LK  
 Sbjct: 328 CSSQEFKKAFQNVLK 342

10 / 34

図 10



11/34

图 1 1

X64878	MEGALAAN---WSA-EAA-NASAAPPAGAEG-----NRTAGPPRRNEALARVEAVLCLIL	*****
U82440	MEGELAAN---NST-EAV-NSSAAPPAGAEG-----NCTAGPPRRNEALARVEAVLCLIL	
X93313	MEGLCLNL---DCS-ELP-NSSWVNNSMENQNHSSNSTRDPLKRNEEVAKVEVTVLALIL	
X87783	MEEMFKEQDF-WSFNESSRNSTVGNETFGG-----NQTVNPLKRNEEVAKVEVTVLALVL	
AF184966	-----MEKPGNI TLHP-----NGSDPFGRNNEEVAKIEINVLSITF	
X76321	-----MGR1ANQTTAS-----NDTDPFGRNEEVAKMEITVLSVTF	
AF147743	MKNFSFPMQD-STHQTESPPHRLLSLTNKS-----DPVGRPERDEQLAQVEIAVLGVIF	
GPRv8	MPANFTEGSFDSSGTGQTLDSSPVACTETVTFTEVVEGKEWGSFYYSFKTEQLITLWLF	
AE003754	-----MKCDHTLFFALFQTEQFAVLWLF	
. . . * : :		
TM1 ***** TM2 *****		
X64878	LLALSGNACVLLALRTTRQKHSRLFFFMKHLSIADLVAVFQVLPQLWDTFRFYGPDL	
U82440	FLALSGNACVLLALRTTRQKHSRLFFFMKHLSIADLVAVFQVLPQLWDTFRFYGPDL	
X93313	FLALAGNICVLLGIYINRHKHSRMYFFMKHLSIADLVAVFQVLPQLWDTFRFYAPDL	
X87783	FLALAGNLCVLIAYTAKHTQSRMYYLMKHLISIADLVAVFQVLPQLWDTFRFYGPDF	
AF184966	VVAVIGNVSLLAMNYNTKKKMSRMHFLIKHLSIADLVAVFQVLPQLWDTFRFYGPDF	
X76321	FVAVIGNLSVLLAMHNTKKKSSRMHFLIKHLSIADLVAVFQVLPQLWDTFRFYGPDF	
AF147743	LTASVGNFILILVWRRRKLSRMYVFLHLSIADLVAVFQVLPQLWDTDVFIGPDF	
GPRv8	VFTIVGNSVLFSTWR-RKKKSRTFFFVQLA1TDSFTGLVN1LTDINWRFTGDFTAPDL	
AE003754	TVIVLGNSAVLFVMF1NKNRKSRMNYFIKQLALADLCVGLNVLTDIWRITISWRAGNL	
** : : : : : * : : : : : * : : : : : * : : : : : * : : : :		
***** TM3 ***** ***** TM4 *****		
X64878	LCRLVKYLQVVGMASTYLLLLMSLDRCLA1CQPLRSLRRRT--DRLAVLATWLGCCLVAS	
U82440	LCRLVKYLQVVGMASTYLLLLMSLDRCLA1CQPLRSLRRRT--DRLAVLATWLGCCLVAS	
X93313	VCRLVTYLQVVGMASTYMLLLMSLDRCLA1CQPLRSLHRRS--DCVYVLFTWILSFLLS	
X87783	LCRLVKYLQVVGMASTYMLVMSIDRCIA1CQPLRSLHKR--DRCYVIVSWALSLVFS	
AF184966	LCRIVKHLQVGMFASTYMMVMTLDRYIA1CHPLKTLQQPTQRSYIMIVSTWMCSLVFS	
X76321	LCRIVKHLQVGMFASTYMMVMTLDRYIA1CHPLKTLQQPTQRAYIMIGSTWLCSLLS	
AF147743	LCRIVKYLQLLGMFASTYMIIVMVTDRYQAVCPMVTFQKKRALWNIPICTWSISLILS	
GPRv8	VCRVVRYLQVVLLYASTYVLVSLSIDRYHAIYVPMKFLQGEKQ-ARVLIVIAWSLSFLFS	
AE003754	ACKAIRFSQVCVTSSTYVLYVAMSIDRYDA1THPMNFSKSWKR-ARHLVAGAWLI SALFS	
*: : . * : : : * : : : : : * : : : : : * : : : :		
***** TM5 *****		
X64878	APQVHIFSLREVADG--VFDCWAVF1QP--WGPKAYITWITLAVYIVPVIVLATCYGLIS	
U82440	APQVHIFSLREVADG--VFDCWAVF1QP--WGPKAYITWITLAVYIVPVIVLAACYGLIS	
X93313	TPQTVIFSLTEVGNG--VYDCRADF1QP--WGPKAYITWITLAVYIIPVIMILSVCYGLIS	
X87783	VPQVYIFSLRE1GNG--VYDCWDFVQP--WGAKAYITWISLTIYIIPVAILGGCYGLIS	
AF184966	TPQYFIFSLSEVKNGSTVKDCWAHFIEP--WGARAYITWITGGIFLVPVVLVNCYGFIC	
X76321	TPQYFIFSLSE1QNGSYVYDCWGHFIEP--WGIRAYITWITVGIFLIPVILMICYGFIC	
AF147743	LPQVFIFSKIE1SPG--IFECWAEF1QP--WGPRAVVTWILVVIFFIPSTILITCQVKIC	
GPRv8	IPTLIIFGKRTLSNG-EVQCWALWPDDSYWTP--YMTIVAFLVYFIPLTIIISINYGIVI	
AE003754	LPILVLYEKL1QGH--PQCWIELGSP1AWQV--YMSLVSATLFAIPALIIISACYAIV	
* : : : : : * : : : : : * : : : : : * : : : :		

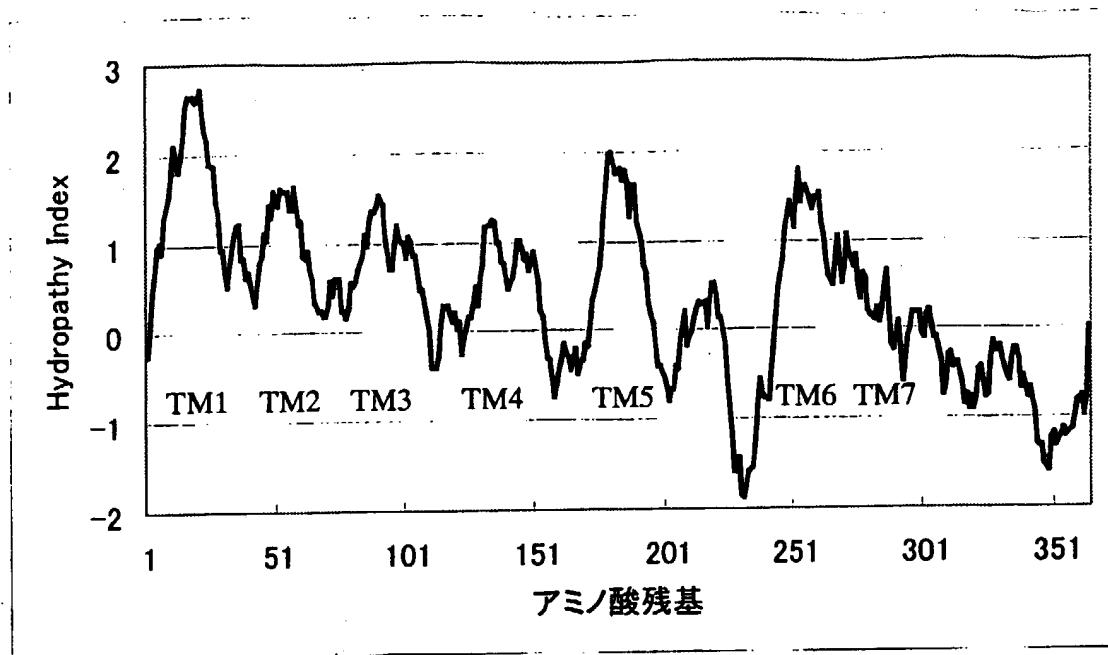
12 / 34

☒ 1 2

X64878	FKIWQNLRLKTAaaaaaAPEGAAAGDGGRVALARVSSVLIISAKAKRTVKMTFIIVLAF	***** TM6
U82440	FKIWQNLRLKTAaaaaaAPEGAAAGDGGRVALARVSSVLIISAKAKRTVKMTFIIVLAF	
X93313	YKIWQNLRLKTVCESNLLRLST-----SRRATLSRVSSVRLISAKAKRTVKMTFIIVLAY	
X87783	FKIWQNFKRKTKKDQCITLTAA---SKANALARVSSVKLVSKAKITTVKMTFVIVLAY	
AF184966	HTIWKNIKYKKRKTPGAAS---KNGLIGKNSVSSVTTISRAKLRTVKMTFVIVLAY	
X76321	HSIWKNIKCK---TMRGTRNT---KDGMIGKVSVSSVTLISRAKLRTVKMTLIVIVLAY	
AF147743	KIIKRNIYVKKQNEYQVTNQ---KQVLPSSRASSVNCISKAMIKTVKMTIVTVVAY	
GPrv8	RTIWIKSKTYETVISNCSDG---KLCSSYNRGLISKAKIKAIKYSIIILAF	
AE003754	KTIWAKGSIFVPTERAGFA---APARRASSRGIIIPRAKVKTVKMTLIVFVF	
	*	.....* : : * : : ..
		***** TM7 *****
X64878	IVCWTPFFFVQMWSVWDANAPK---EASAFIIVNLLASLNCCNPWIYMLFTGHLFHELV	
U82440	IVCWTPFFFVQMWSVWDANAPK---EASAFIIVNLLASLNCCNPWIYMLFTGHLFHELV	
X93313	IVCWTPFFFVQMWSVWDNPNNPK---EASLFIIAMLLGSLNCCNPWIYMLFTGHLFHDLK	
X87783	IVCWTPFFFVQMWSVWDENFSWDDSENAAVTLSALLASLNCCNPWIYMLFSGHLLQDFM	
AF184966	IVCWAPFTVQMWSVWDENFQYADSENTAVTISALLASLNCCNPWIYMLFSGHLLYDFL	
X76321	VLCWSPFFIAQLWSVWPSGIT---EGSAFTIIMLLGNLNCTNPWIYMYFCGHIPY---	
AF147743	ICCWSPYFLFDILDNFNLLPDT-QERFYASVIIQNLPALNSAINPLIYCFSSSISFP--	
GPrv8	ICCWSPYIIFDLLQVFGQIPH-SQTNIAIATF1QSLAPLNSAANPLIYCLFSSQVFRTLS	
AE003754	: * : * : : : . : . : * ***. ** ** * . :	
X64878	QR---FLCCSASYLKGRRLG---ETSASKKS-----SSFVLSHRSSSQRSCSQPS	
U82440	QR---FLCCSASYLKGRRLG---ETSTSCKS-----SSFVLSHRSSSQRSCSQPS	
X93313	QS---FLCCSARYLKTQQQGS-DLSASRKSN-----SSTFVLSRKSSSQKSITQPS	
X87783	QS---LLCCSTLYLKSSQCRCDQEHDLSRKSN-----CSTYVIKSTS-QRSITQSS	
AF184966	NC---FAMCRANADFKED---SDSSIRRTT-----LLTKMTN-RSPTGSTGNWRD	
X76321	RC---FPCCKKPRNNLQKED---SDSSIRRTT-----LLTKLAAGRMTNDGFGSWRD	
AF147743	-----CTNKQLENTSAQ---EDSVVTGS-----IHLVD-RDPEENSTCA--	
GPrv8	-----CREQRSDSRT---FRERTER-----HENQILS--KP-EF--	
AE003754	RFPPFKWFTCCCKSYRNNSQQNRCHTVGRRLHNNSCDMRTLTTSLTVSRRSTNKTNARVV	
	*	.
X64878	TA-----	
U82440	TA-----	
X93313	TA-----	
X87783	IT-----	
AF184966	LDNSPK--TSIQME-----	
X76321	PCNSRKSSQS1GLDCFKSSQCLEHDCSRKSSQC1PLDCSRKSSQC1PLDCSRKSSQCM5	
AF147743	-----	
GPrv8	-----	
AE003754	ICERPTKVTVPMAMSERGVSLSKGNTDIL-----	
X64878	---	
U82440	---	
X93313	---	
X87783	---	
AF184966	---	
X76321	KES	
AF147743	---	
GPrv8	---	
AE003754	---	

13 / 34

図 13



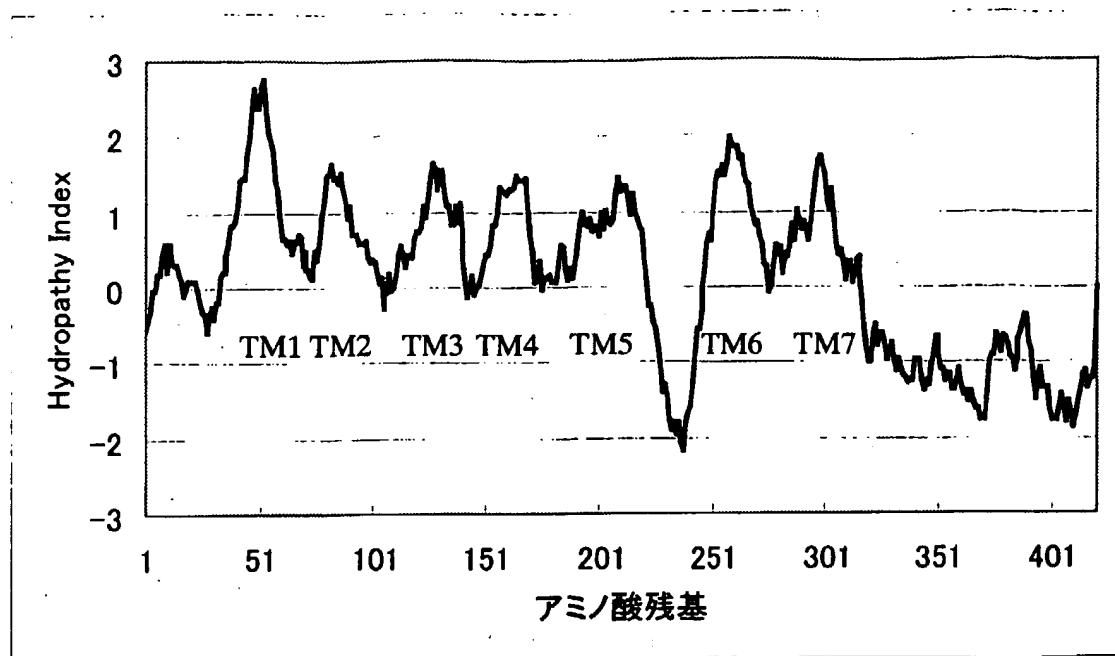
14 / 34

図14

GPRv12_ORF AF208288	***** TM1 *****	***** TM2 ***
	MGPGEALLAGLLVMVLAVALLSNALVLLCAYSAELRTRASGVLLVNLSLGHLAAALDM MNSWDAGLAGLVTGVSLLSNGLVLLCLLHSADIRRQAPALFTLNLTGNLLCTVVNM *.. :* ***** . .:****.**** :***:*** :*.. : :***: *:*** :..:*	
GPRv12_ORF AF208288	***** TM3 *****	
	PFTLLGVMRGRTPSAPGACQV1GFLDTFLASNAALSAALSADQWLAVGFPRLYAGRRLP PLTLAGVVAQRQPAGDRLCRLAFLDTFLAANSMLSMAALSIDRWVAVVFPPLSYRAKMRL *:*** :* :*.. :* : .*****:*: :***:*** :*:*** *** * .:*	
GPRv12_ORF AF208288	***** TM4 *****	*****
	RYAGLLLGCAGQSLAFSGAALGCSWLGYSSAFASCRLPPEPERPRFAFTATLHAVG RDAAFMVAYTWLHALTFPATLALSWLGFHQLYASCTLCRRPDERLRFAVFTSAFHALS * .:.. :* :* :*.. :**. ***: . :***:*** :***.***:***:***:..	
GPRv12_ORF AF208288	TM5 *****	**
	FVLPLAVLCLTSQVHRVARRHCQRMDTVTMKALALLADLHPSVRQRCLIQQKRRRHAT FLLSFIVLCFTYLKVLKVARFHCKRIDVITMQTLVLLVDIHPSVRERCLEEQKRRQRAT *:.. : ***: * :* :*** **: * :. :***:*. ***:***:*** :***:***:***	
GPRv12_ORF AF208288	***** TM6 *****	***** TM7 *****
	RKIGIAIATFLICFAPYVMTRLAELVPFVTVNAQWQGILSKCLTYSKAADPFTYSLRRP KKISTFIGTFLVCFAPYVITRLVELFSTAPIOSHVGVLSKCLAYSKAASDPFVYSLLRHQ :*. * .***:***:***:***.**.. . .:***:***:***:***. :***. :***:	
GPRv12_ORF AF208288	FRQVLAGMVHRLLKRTPRPASTHDSSLVAGMVHQLLKRTPRPASTHGSVDTENDSCLQ YRRSCKELLNRIFNRR---SIHSVGLTGDSHSQNILPVSE-----	
	:*: : : : :* * . * . : :* :	
GPRv12_ORF AF208288	QTH ---	

15 / 34

図15



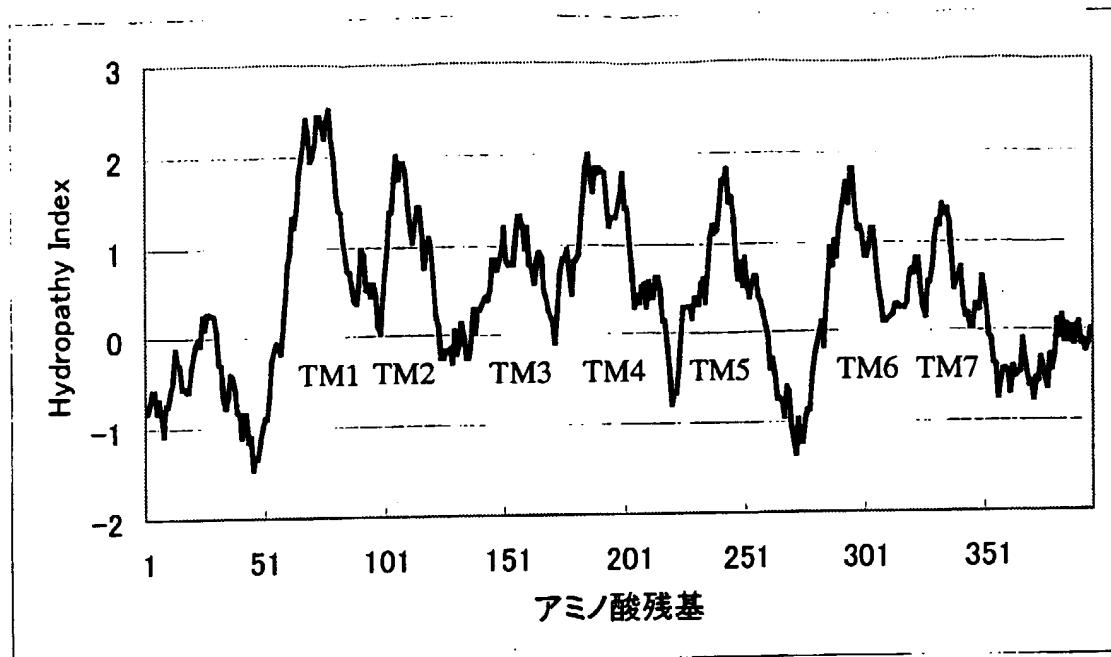
16 / 34

図 16

		*****
	*****	TM1 *****
1	MLAAAFADSN SSSMNVSFAH LHFAAGGYLPS DSQDWRTIIP ALLVAVCLVG FVGNLCVIGI	60
	*****	*****
	## ***** TM2 *****	
61	LLHNNAWKGP SMIHSLILNL SLADLSLLL SAPIRATAYS KSVWDLGWFV CKSSDWFIHT	120
	*****	*****
	0***** TM3 *****	***** TM4 *****
121	CMAAKSLTIV VVAKVCFMYA SDPAKQVSIH NYTIWSVLVA IWTVASLLPL PEWFFSTIRH	180
	*****	*****
	0 ***** TM5 *****	
181	HEGVEMCLVD VPAVAEEFMS MFGKLYPLLA FGLPLFFASF YFWRAYDQCK KRGTKTQNLR	240
	*****	*****
	***** TM6 *****	***** TM7 ##
241	NQIRSKQVTV MLLSIAII SA VLWLPEWVAW LWVWHLKAAG PAPPQGFIAL SQVLMFSISS	300
	*****	
	*****	
301	ANPLIFLVMS EEFREGLKGV WKWMITKKPP TVSESQETPA GNSEGLPDKV PSPESPASIP	360
361	EKEKPSSPSS GK GKTEKAEI PILPDVEQFW HERDTVPSVQ DNDPIPWEHE DQETGEGVK	419

17 / 34

図 17



18

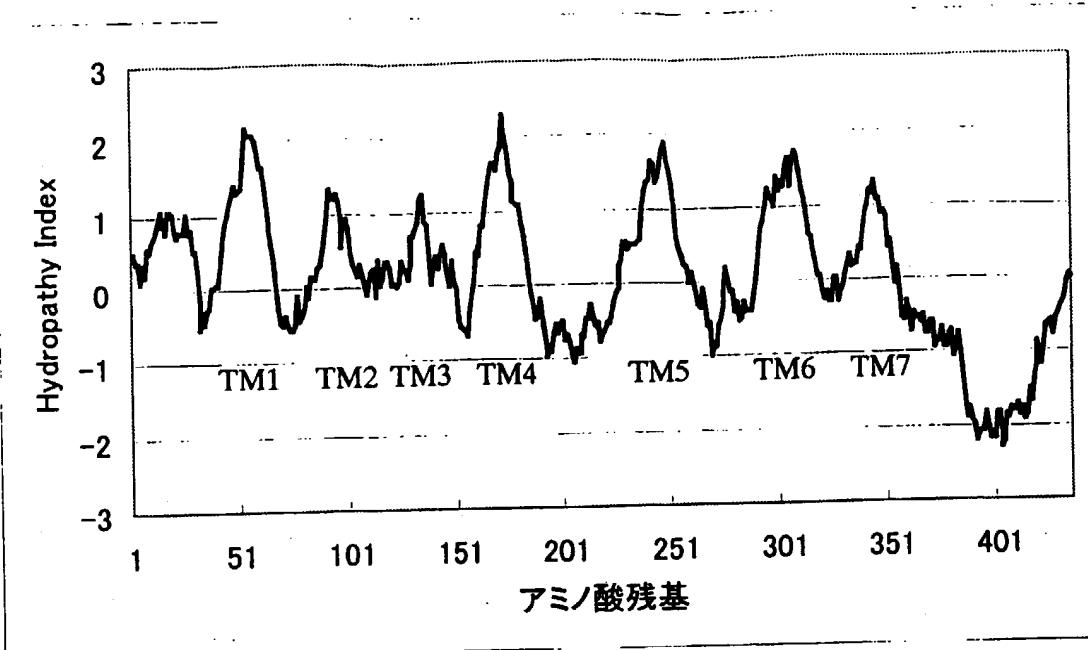
19 / 34

図 19

GPRv21	TVLVI1VKSQ--EK1FCGQ1WPVDQQ-LYYKSYFLF1FGIEFVGPVVTM1CYAR1SRELW
AL121755	TVLF1VKSQ--EK1FCGQ1WPVDQQ-LYYKSYFLF1FGIEFVGPVVTM1CYAR1SRELW
AF236082	TVLV1VERQ--EK1FCGQ1WPVDQQ-FYYRSYFLLVFGLEFVGPVVTM1CYAR1SRELW
U42766	SL1E1IPDF--EIVACTEKWPGEEKSIYGTVYSLSSLL1LYVLPLGI1SFSYTRIWSKLK
U76254	SL1E1IPDF--EIVACTEKWPGEEKSIYGTVYSLSSLL1LYVLPLGI1SFSYTRIWSKLK
U42389	SL1E1IPDF--EIVPCTEKWPGEEKSIYGTVYSLSSLL1LYVLPLGI1SFSYTRIWSKLK
U50144	SL1E1IPDF--EIVACTEKWPGEEKGIYGT1YSLSSLL1LYVLPLGI1SFSYTRIWSKLK
D86238	SL1E1IPDF--EIVACTEKWPGEEKSVYGTVYSLSTLL1LYVLPLGI1SFSYTRIWSKLK
M81490	D1PMSPWHTKCEKY1CREMWPSSQ---EYYTSLFALQFVVPPLGVLIFTYAR1TIRVW
AF037444	TKQSNSTGL-----CLEHFENDHN---RYIYSIV1MMLQYFVPLAV1TVTNTHIGY1VW
	* : : * : : : * : : : : : : : :
	***** TM6 *****
GPRv21	FKAVPG-FQTEQ1RKRLRCRRKTV1VLMC1LTAYVLCWAPFYGFT1VRDFFPTVFKKEKH
AL121755	FKAVPG-FQTEQ1RKRLRCRRKTV1VLMC1LTAYVLCWAPFYGFT1VRDFFPTVFKKEKH
AF236082	FKAVPG-FQTEQ1RRTVCRRTV1GLVVCVL1SAYVLCWAPFYGFT1VRDFFPSVFKKEKH
U42766	NHVS PG-AANDHYHQR---RQKTTKMLVCVVVFAVSWLPLHAFQLAVD-1DSQVLDLKE
U76254	SHVSPG-AANDHYHQR---RQKTTKMLVCVVVFAVSWLPLHAFQLAVD-1DSQVLDLKE
U42389	NHVS PG-AANDHYHQR---RQKTTKMLVCVVVFAVSWLPLHAFQLAVD-1DSQVLDLKE
U50144	NHVS PG-AAHDHYHQR---RQKTTKMLVCVVVFAVSWLPLHAFQLAVD-1DSHVLIDLKE
D86238	NHVS PG-AASDHYHQR---RHKMTKMLVCVVVFAVSWLPLHAFQLAVD-1DSHVLIDLKE
M81490	AKRPPGEAETNRDQRMARSKRKVMKMLTVV1VFTCCWLPFN1LQLLLN--DEEFAHWDP
AF037444	1KKTPGEAEEDRDRRMAASKRRLVKM11VVV1YAVCWLVPVH1TLYGD-HNPDIYNQPH
	: ** :
	***** TM7 *****
GPRv21	YLTAFY1VEC1AMNSMINTLCFVTVKNDTVK1YFKK1ML-----LHWKASYNGKS
AL121755	YLTAFYVVEC1AMNSMINTVCFVTVKNNTMKYFKKMML-----LHWRPSQRGSKS
AF236082	YLTAFYVVEC1AMNSMINTLCFVTVRNNTSKYLKR1LR-----LQWRASPSGSKA
U42766	YKL1IFTVFH11AMCSTFANPLLYGWMNSNYRKAFLSAFR-----CEQRLD1IHSEV
U76254	YKL1IFTVFH11AMCSTFANPLLYGWMNSNYRKAFLSAFR-----CEQRLD1IHSEV
U42389	YKL1IFTVFH11AMCSTFANPLLYGWMNSNYRKAFLSAFR-----CEQRLD1IHSEV
U50144	YKL1IFTVFH11AMCSTFANPLLYGWMNSNYRKAFLSAFR-----CEQRLD1IHSEV
D86238	YKL1IFTVFH11AMCSTFANPLLYGWMNSNYRKAFLSAFR-----CEQRLD1IHSEV
M81490	LPYVWFHWLAMSHCCYNP11CYCMNARFRSGFVQLMHRMPGLRRWCLRSVGDRMMAT
AF037444	MNVVNLCAQWLAMSHSCYNP1VFSLSATFRRNLRRMTHACRLKQKR-LRQHLSMRSSRA
	: : **. *.. : : : : : : : : : : : : : :
GPRv21	S-----ADLDLKT1GM-----PATEEVDCIRLK-----
AL121755	S-----ADLDLRTNGV-----PTTEEVDCIRLK-----
AF236082	S-----ADLDLRTTG1-----PATEEVDCIRLK-----
U42766	SVTFKAK-----KNLEVRKNSG-----PNDSFTEATNV-----
U76254	SVTFKAK-----KNLEVRKNSG-----PNDSFTEATNV-----
U42389	SVTFKAK-----KNLEVRKNSG-----PNDSFTEATNV-----
U50144	SVTFKAK-----KHLQVTKNNG-----PNDSFTEATNV-----
D86238	SMTFKAK-----KNLEVKKNNG-----PTDSFSEATNV-----
M81490	SGTGPALPLN-----RMNTSTTYSARRKPRATSLRANPLSGETSPRL-----
AF037444	DAWDRDTEVYGAES1PSKVSAGSLHSSNRGAKHVNTESSGEQCLKEKKLGVSNDML

20 / 34

図20



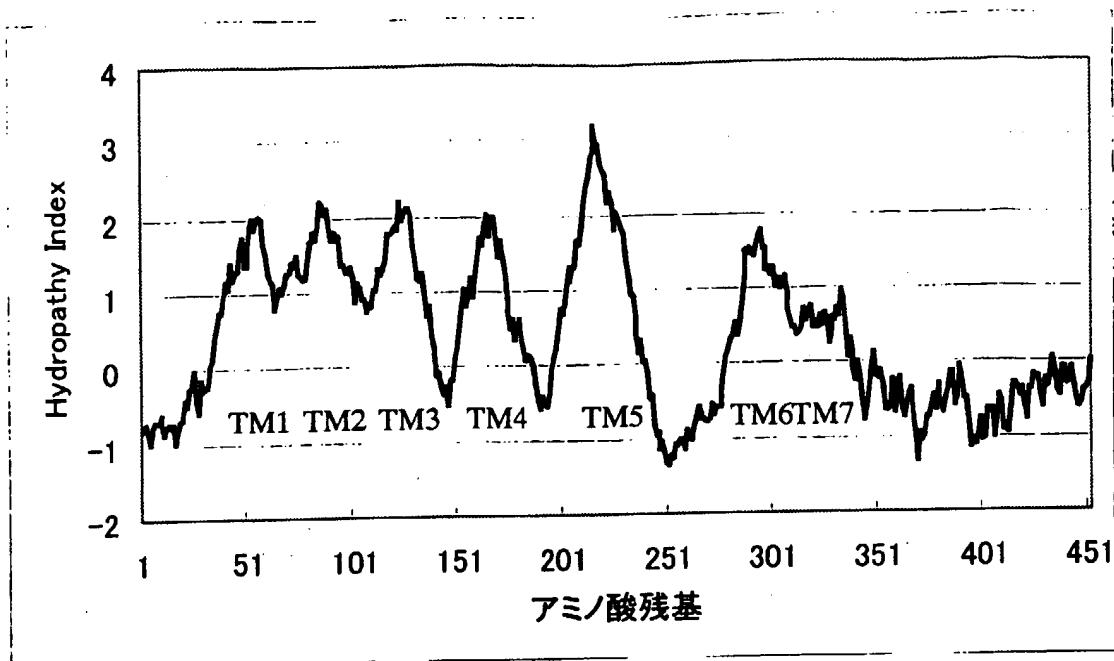
21 / 34

図 21

\*\*  
\*\*\*\*\* TM1 \*\*  
1 MEDLFSPSIL PPAPNISVPI LLGWLNLTL GQGAPASGPP SRRVRLVFLG VILVVAVAGN 60  
\*\*\*\*\*  
\*\*\*\* TM2 \*\*\*\*  
61 TTVLCRLCGG GGPWAGPKRR KMDFLLVQLA LADLYACGGT ALSQLAWELL GEPRATGDL 120  
\*\*\*\*\*  
@ \*\*\*\* TM3 \*\*\*\* TM4 \*\*\*\*  
121 ACRFLQLLQA SGRGASAHLV VLIALERRRA VRLPHGRPLP ARALAALGWL LALLLALPPA 180  
\*  
\*\*\*\*\*  
\*\*\* @ \*\*\*\* TM5  
181 FVVRGDSPSP LPPPPPTSL QPGAPPAARA WPGQRRCHGI FAPLPRWHLQ VYAFYEAVAG 240  
\*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\*  
241 FVAPVTVLGV ACGHLLSVWW RHRPQAPAAA APWSASPGRA PAPSALPRAK VQSLKMSLLL 300  
\*\*\*\*\*  
\* TM6 \*\*\*\* TM7 \*\*\*\*  
301 ALLFVGCELP YFAARLAAAW SSGPAGDWEG EGLSAALRVV AMANSALNPF VYLFFQAGDC 360  
361 RLRRQLRKRL GSLCCAPQGG AEDEEGPRGH QALYRQRWPH PHYHHARREP LDEGGLRPPP 420  
421 PRPRPLPCSC ESAF

22 / 34

図22



23/34

図 23

24 / 34

## 図24

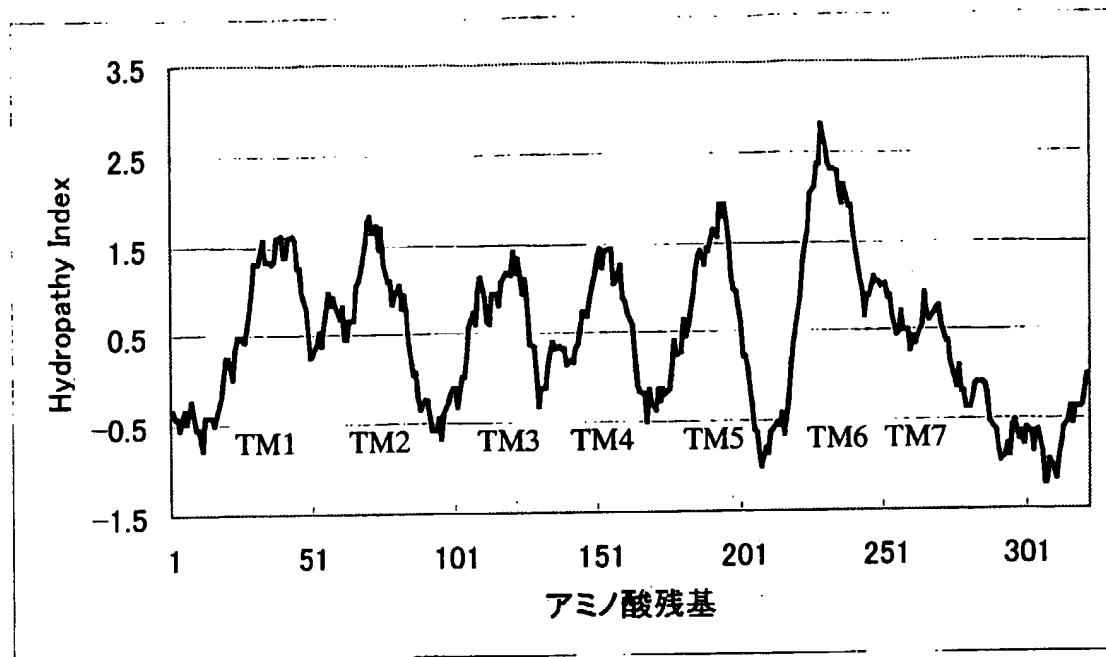
25 / 34

図 25

HSH2R_1	QEEKPLKLQVWSGTEVT-----
D49783	QEEKPLKLQVWSGTEVTAPQGATDR-----
M32701	QEEKPLKLQVWSGTEVTAPRGATDR-----
U25440	QEDKPLNLQVWSGTEVTAPQGATNR-----
S57565	QEEKPLKLQVWSGTELTHPQGNPIR-----
S73473	QNS-PLNR--FDGYEGERP-FPT-----
M74716	QNS-PLNR--FDGYEGERP-FPT-----
U64032	SAGAALPGAALALTAAPAPSSAAPEGQAAGAGRKPPCAFREWRLGPLRRPTTQLRAK
L41147	QQVLPPLPPLPPSDSDSDAGSGGSSGLRLTAQLLPGEATQDPLPTRAAAVNFFNIDPA
GPRv47	LQGTGCPSESWSRPLPSKQEPPAVDFRIPGQIAEETSEFLEQQLTSDIIMSDSYLRPA
D43633	IQRRTSSSSETHPSFANSNP-RNMENQAHKIPGQIPEEQA-----
HSH2R_1	-----
D49783	-----
M32701	-----
U25440	-----
S57565	-----
S73473	-----
M74716	-----
U64032	VSSLSHKIRAGGAQRAEAACALRSEVEAVSVAEDNTCQAYELADYRNLRDTI
L41147	EPELRPHPLGIPTN-----
GPRv47	ASPRLES-----
D43633	-----

26 / 34

図26



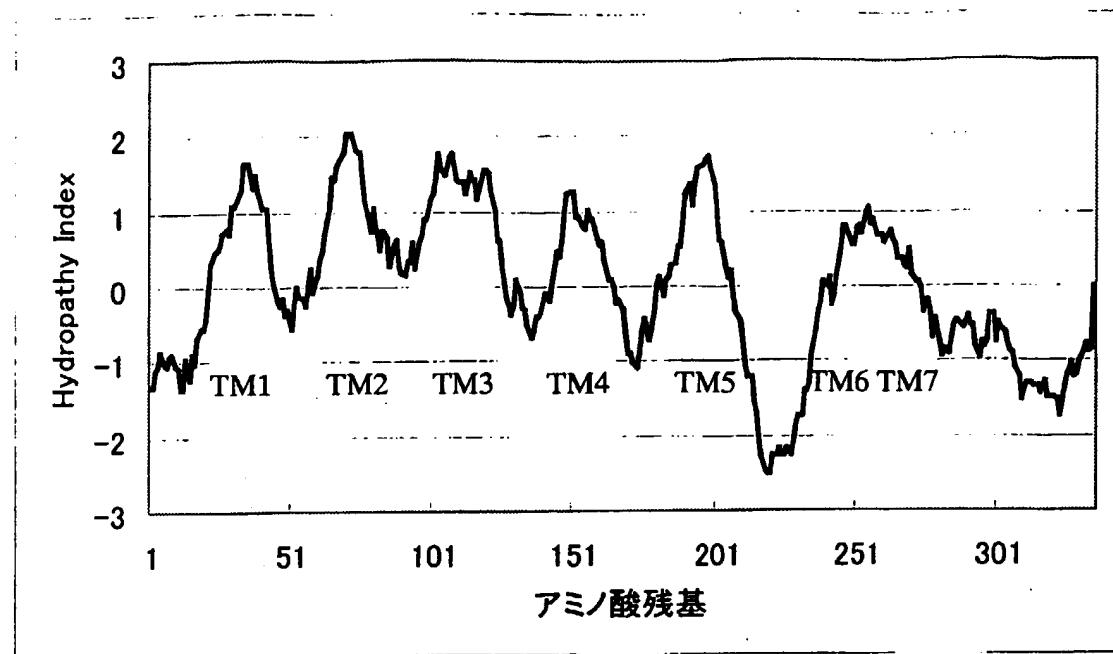
27 / 34

図27

		***** TM1 *
GPRv51	-----MNQTLNSSGTVESALNYSRGSTVHTAYLVLSSLAMFTCLCGMA	
M35297	MAGNCWSWEAHSTNQNKMCPGMSEALELYSRGFLTIEQIATLPPAVTNYIFLLLCLCGLV	
	**. ..* *: **** . .*. : : : ***:.	
		***** TM2 *****
GPRv51	GNSMVIWLLGFRMHRNPFCIYILNLAAADLLFLFSMASTLSLETQPLVN-TTDKVHELMK	
M35297	GNGLVLWFFGFSIKRTPFSIYFLHLASADGIYLSKAVIALLNMGTFLGSFPDYVRRVSR	
	**. :*:***:*** :*:***:***:***:*** :***:*** * : :.. .* *:.. :	
		***** TM3 ***** ***** TM4 *****
GPRv51	RLMYFAYTVGLSLTAISTQRCLSVLFPWFKCHRPRHLSAWCGLLWTLCLLMNGLTSS	
M35297	IVGLCTFFAGVSLLPAISIERCVSVIFPMWYWRRRPKRLSAGVCALLWLLSFLVTSIHNY	
	: : : .*:***.*** :***:***:***: :***:*** ***.*** * .:***: .	
		***** TM5 *****
GPRv51	FCSKFLKFNE-DRCFRVDMVQAALIMGVLTPVMTLSSLTLFVWVRRSSQQWRQPTRLFV	
M35297	FCMFLGHEASGTACLNMDISLGILLFFLFCPLMVLPCALILHVECRARRQRS-AKLNH	
	** : : . *:.: . *:: : : *:*. . *:***: . : : : * . : : : * . : : *	
		***** TM6 ***** ***** TM7 *****
GPRv51	VVLASVLVFLICSLPLSIYWFVLYWLSPPEMQVLCFSLSRLSSSVSSSANPVIYFLVGS	
M35297	VVLAIVSVFLVSSIYLGIDWFLWFQIP---APFPEYVTDLCICINSSAKPIVYFLAGR	
	**** * ***:..*: .* * ***:..:***: .:*** : : : . . .***:***:***:*	
		***** TM8 *****
GPRv51	RRSHRLPTRSLGTVLQQALRE--EPELEGGETPTVGTNEMGA-----	
M35297	DKSQRLWEP-LRVVFQRALRDGAEPGDAASSTPNTVTMEMQCPGNA	
	:*:*** * .*:***:***: ** ...***. * ** .	

28 / 34

図28



29 / 34

图 29

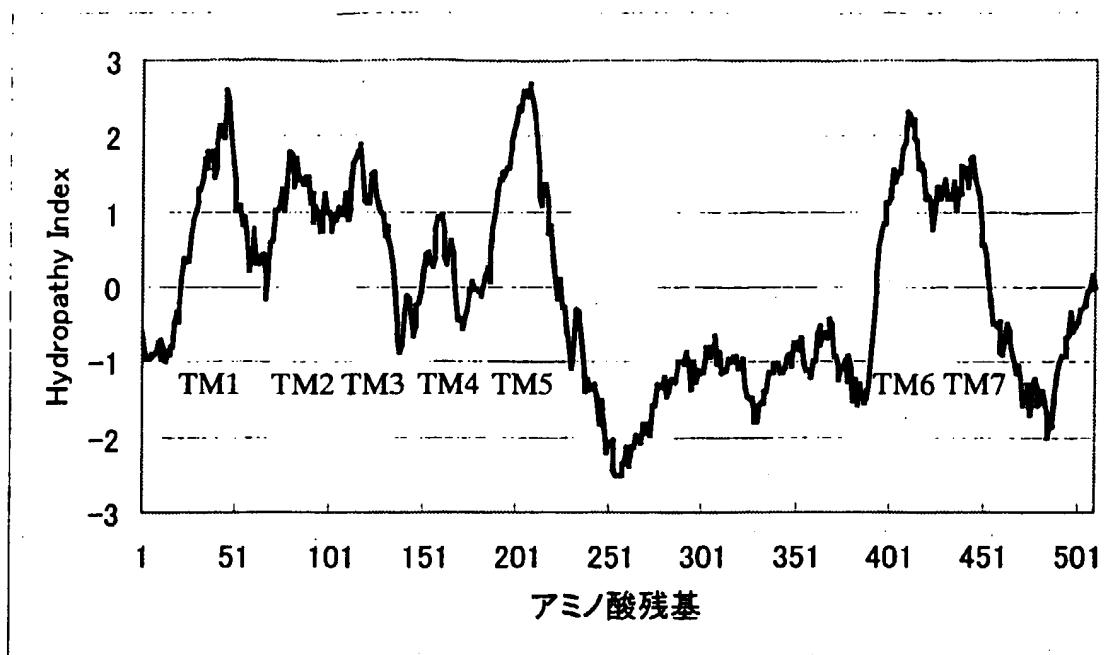
30 / 34

图 30

	***** TM7 *****
Y14705	YKVTRPLASANSCLDPVLYLFTGDKYRNQLQQLCRGSK--PKPR-----TAASSL
AJ277752	YKVTRPLASANSCLDPVLYLFTGDKYRNQLQQLCRGST--PKRR-----TTASSL
AF031897	YK1TRPLASINSCLDPILYFMAGDKYRGRLRRGAAQR--P-R-----PVPTSL
X99953	YKVTRPLASANSCIDPILYFLANDRYRRRL1RTVRRRSSVPNRRCMHTNHPQTEPHMTAG
AF069555	YKCTRPFASMSVLDPILFYFTQRKFRESTRYLLDKMS-----SKWRHD
X98283	YKCTRPFASMSVLDPILFYFTQRKFRESTRYLLDKMS-----SKWRQD
D63665	YKGTRPFASANSVLDPILFYFTQQKFRQQPHOLLQKLT-----AKWQRQ
GPRv71	DMEASGECEQLPQPSPVLSFKGGKNVRLLQKLRQNKLG-----EHPAGRK
	: . . . . *:*
Y14705	ALVTLHEES1SRWADTHQDSTFSAYEGDRL-----
AJ277752	ALVTLHEES1SRWADIHQDS1FPAYEGDRL-----
AF031897	LALVSPSVDSVVGSCCNSE---SRGMGTVNSRGQ-----
X99953	PLPV1SAEE1PSNGSMVRDENGEGRSREHRVETDTKE1NQMMNRRST1KRNSTDKNDMKE
AF069555	HCITYGS-----
X98283	HCISYGS-----
D63665	RV-----
GPRv71	RCGPLNRSG-----
Y14705	-----
AJ277752	-----
AF031897	-----
X99953	NRHGENYL PYVEVVEKEDYETKRENRKTEQSSKTNAEQDELQTLQIDSRLKRGKWLSSK
AF069555	-----
X98283	-----
D63665	-----
GPRv71	-----
Y14705	-----
AJ277752	-----
AF031897	-----
X99953	KGAAQENEKGHMEPSFEGEGTSTWNLLTPKMYGKKDRLAKNVEEVGYGKEKELQNFPKA
AF069555	-----
X98283	-----
D63665	-----
GPRv71	-----

31 / 34

図31



32 / 34

図32

図 3 3

3 4 / 3 4

图 3-4

1 / 6 6

SEQUENCE LISTING

<110> HELIX RESEARCH INSTITUTE

<120> Novel G protein-coupled receptors and genes encoding them,  
and their production and use.

<130> H1-113DP1PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-375152

<151> 1999-12-28

<150> JP 2000-101339

<151> 2000-03-31

<160> 63

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 371

<212> PRT

2 / 6 6

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Met Pro Ala Asn Phe Thr Glu Gly Ser Phe Asp Ser Ser Gly Thr Gly

1

5

10

15

Gln Thr Leu Asp Ser Ser Pro Val Ala Cys Thr Glu Thr Val Thr Phe

20

25

30

Thr Glu Val Val Glu Gly Lys Glu Trp Gly Ser Phe Tyr Tyr Ser Phe

35

40

45

Lys Thr Glu Gln Leu Ile Thr Leu Trp Val Leu Phe Val Phe Thr Ile

50

55

60

Val Gly Asn Ser Val Val Leu Phe Ser Thr Trp Arg Arg Lys Lys Lys

65

70

75

80

Ser Arg Met Thr Phe Phe Val Thr Gln Leu Ala Ile Thr Asp Ser Phe

85

90

95

Thr Gly Leu Val Asn Ile Leu Thr Asp Ile Asn Trp Arg Phe Thr Gly

100

105

110

Asp Phe Thr Ala Pro Asp Leu Val Cys Arg Val Val Arg Tyr Leu Gln

115

120

125

3 / 6 6

Val Val Leu Leu Tyr Ala Ser Thr Tyr Val Leu Val Ser Leu Ser Ile

130 135 140

Asp Arg Tyr His Ala Ile Val Tyr Pro Met Lys Phe Leu Gln Gly Glu

145 150 155 160

Lys Gln Ala Arg Val Leu Ile Val Ile Ala Trp Ser Leu Ser Phe Leu

165 170 175

Phe Ser Ile Pro Thr Leu Ile Ile Phe Gly Lys Arg Thr Leu Ser Asn

180 185 190

Gly Glu Val Gln Cys Trp Ala Leu Trp Pro Asp Asp Ser Tyr Trp Thr

195 200 205

Pro Tyr Met Thr Ile Val Ala Phe Leu Val Tyr Phe Ile Pro Leu Thr

210 215 220

Ile Ile Ser Ile Met Tyr Gly Ile Val Ile Arg Thr Ile Trp Ile Lys

225 230 235 240

Ser Lys Thr Tyr Glu Thr Val Ile Ser Asn Cys Ser Asp Gly Lys Leu

245 250 255

Cys Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Leu Ile Ser Lys Ala Lys Ile Lys Ala

4 / 6 6

260

265

270

Ile Lys Tyr Ser Ile Ile Ile Leu Ala Phe Ile Cys Cys Trp Ser

275

280

285

Pro Tyr Phe Leu Phe Asp Ile Leu Asp Asn Phe Asn Leu Leu Pro Asp

290

295

300

Thr Gln Glu Arg Phe Tyr Ala Ser Val Ile Ile Gln Asn Leu Pro Ala

305

310

315

320

Leu Asn Ser Ala Ile Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Val Phe Ser Ser Ser

325

330

335

Ile Ser Phe Pro Cys Arg Glu Gln Arg Ser Gln Asp Ser Arg Met Thr

340

345

350

Phe Arg Glu Arg Thr Glu Arg His Glu Met Gln Ile Leu Ser Lys Pro

355

360

365

Glu Phe Ile

370

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 363

5 / 6 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Gly Pro Gly Glu Ala Leu Leu Ala Gly Leu Leu Val Met Val Leu  
1 5 10 15

Ala Val Ala Leu Leu Ser Asn Ala Leu Val Leu Leu Cys Cys Ala Tyr  
20 25 30

Ser Ala Glu Leu Arg Thr Arg Ala Ser Gly Val Leu Leu Val Asn Leu  
35 40 45

Ser Leu Gly His Leu Leu Leu Ala Ala Leu Asp Met Pro Phe Thr Leu  
50 55 60

Leu Gly Val Met Arg Gly Arg Thr Pro Ser Ala Pro Gly Ala Cys Gln  
65 70 75 80

Val Ile Gly Phe Leu Asp Thr Phe Leu Ala Ser Asn Ala Ala Leu Ser  
85 90 95

Val Ala Ala Leu Ser Ala Asp Gln Trp Leu Ala Val Gly Phe Pro Leu  
100 105 110

Arg Tyr Ala Gly Arg Leu Arg Pro Arg Tyr Ala Gly Leu Leu Leu Gly

6 / 6 6

115

120

125

Cys Ala Trp Gly Gln Ser Leu Ala Phe Ser Gly Ala Ala Leu Gly Cys

130

135

140

Ser Trp Leu Gly Tyr Ser Ser Ala Phe Ala Ser Cys Ser Leu Arg Leu

145

150

155

160

Pro Pro Glu Pro Glu Arg Pro Arg Phe Ala Ala Phe Thr Ala Thr Leu

165

170

175

His Ala Val Gly Phe Val Leu Pro Leu Ala Val Leu Cys Leu Thr Ser

180

185

190

Leu Gln Val His Arg Val Ala Arg Arg His Cys Gln Arg Met Asp Thr

195

200

205

Val Thr Met Lys Ala Leu Ala Leu Ala Asp Leu His Pro Ser Val

210

215

220

Arg Gln Arg Cys Leu Ile Gln Gln Lys Arg Arg Arg His Arg Ala Thr

225

230

235

240

Arg Lys Ile Gly Ile Ala Ile Ala Thr Phe Leu Ile Cys Phe Ala Pro

245

250

255

7 / 6 6

Tyr Val Met Thr Arg Leu Ala Glu Leu Val Pro Phe Val Thr Val Asn

260 265 270

Ala Gln Trp Gly Ile Leu Ser Lys Cys Leu Thr Tyr Ser Lys Ala Val

275 280 285

Ala Asp Pro Phe Thr Tyr Ser Leu Leu Arg Arg Pro Phe Arg Gln Val

290 295 300

Leu Ala Gly Met Val His Arg Leu Leu Lys Arg Thr Pro Arg Pro Ala

305 310 315 320

Ser Thr His Asp Ser Ser Leu Asp Val Ala Gly Met Val His Gln Leu

325 330 335

Leu Lys Arg Thr Pro Arg Pro Ala Ser Thr His Asn Gly Ser Val Asp

340 345 350

Thr Glu Asn Asp Ser Cys Leu Gln Gln Thr His

355 360

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 419

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

8 / 6 6

&lt;400&gt; 3

Met Leu Ala Ala Ala Phe Ala Asp Ser Asn Ser Ser Ser Met Asn Val

1 5 10 15

Ser Phe Ala His Leu His Phe Ala Gly Gly Tyr Leu Pro Ser Asp Ser

20 25 30

Gln Asp Trp Arg Thr Ile Ile Pro Ala Leu Leu Val Ala Val Cys Leu

35 40 45

Val Gly Phe Val Gly Asn Leu Cys Val Ile Gly Ile Leu Leu His Asn

50 55 60

Ala Trp Lys Gly Lys Pro Ser Met Ile His Ser Leu Ile Leu Asn Leu

65 70 75 80

Ser Leu Ala Asp Leu Ser Leu Leu Leu Phe Ser Ala Pro Ile Arg Ala

85 90 95

Thr Ala Tyr Ser Lys Ser Val Trp Asp Leu Gly Trp Phe Val Cys Lys

100 105 110

Ser Ser Asp Trp Phe Ile His Thr Cys Met Ala Ala Lys Ser Leu Thr

115 120 125

9 / 6 6

Ile Val Val Val Ala Lys Val Cys Phe Met Tyr Ala Ser Asp Pro Ala

130 135 140

Lys Gln Val Ser Ile His Asn Tyr Thr Ile Trp Ser Val Leu Val Ala

145 150 155 160

Ile Trp Thr Val Ala Ser Leu Leu Pro Leu Pro Glu Trp Phe Phe Ser

165 170 175

Thr Ile Arg His His Glu Gly Val Glu Met Cys Leu Val Asp Val Pro

180 185 190

Ala Val Ala Glu Glu Phe Met Ser Met Phe Gly Lys Leu Tyr Pro Leu

195 200 205

Leu Ala Phe Gly Leu Pro Leu Phe Phe Ala Ser Phe Tyr Phe Trp Arg

210 215 220

Ala Tyr Asp Gln Cys Lys Lys Arg Gly Thr Lys Thr Gln Asn Leu Arg

225 230 235 240

Asn Gln Ile Arg Ser Lys Gln Val Thr Val Met Leu Leu Ser Ile Ala

245 250 255

Ile Ile Ser Ala Val Leu Trp Leu Pro Glu Trp Val Ala Trp Leu Trp

260 265 270

10 / 66

Val Trp His Leu Lys Ala Ala Gly Pro Ala Pro Pro Gln Gly Phe Ile

275

280

285

Ala Leu Ser Gln Val Leu Met Phe Ser Ile Ser Ser Ala Asn Pro Leu

290

295

300

Ile Phe Leu Val Met Ser Glu Glu Phe Arg Glu Gly Leu Lys Gly Val

305

310

315

320

Trp Lys Trp Met Ile Thr Lys Lys Pro Pro Thr Val Ser Glu Ser Gln

325

330

335

Glu Thr Pro Ala Gly Asn Ser Glu Gly Leu Pro Asp Lys Val Pro Ser

340

345

350

Pro Glu Ser Pro Ala Ser Ile Pro Glu Lys Glu Lys Pro Ser Ser Pro

355

360

365

Ser Ser Gly Lys Gly Lys Thr Glu Lys Ala Glu Ile Pro Ile Leu Pro

370

375

380

Asp Val Glu Gln Phe Trp His Glu Arg Asp Thr Val Pro Ser Val Gln

385

390

395

400

Asp Asn Asp Pro Ile Pro Trp Glu His Glu Asp Gln Glu Thr Gly Glu

1 1 / 6 6

405

410

415

Gly Val Lys

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 393

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Met Glu Thr Thr Met Gly Phe Met Asp Asp Asn Ala Thr Asn Thr Ser

1

5

10

15

Thr Ser Phe Leu Ser Val Leu Asn Pro His Gly Ala His Ala Thr Ser

20

25

30

Phe Pro Phe Asn Phe Ser Tyr Ser Asp Tyr Asp Met Pro Leu Asp Glu

35

40

45

Asp Glu Asp Val Thr Asn Ser Arg Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val

50

55

60

Ile Gly Met Ala Leu Val Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn

65

70

75

80

12 / 6 6

Phe Ile Phe Ile Ala Ala Leu Val Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu

85

90

95

Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala

100

105

110

Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu

115

120

125

Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Thr Ser Val Asn Tyr Leu Arg

130

135

140

Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile

145

150

155

160

Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys

165

170

175

Gln Thr Ala Thr Gly Leu Ile Ala Leu Val Trp Thr Val Ser Ile Leu

180

185

190

Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile

195

200

205

Val Lys Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp

1 3 / 6 6

210 215 220

Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Ile Phe Gly Ile Glu

225 230 235 240

Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser

245 250 255

Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile

260 265 270

Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu Val Leu Met Cys

275 280 285

Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr

290 295 300

Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr

305 310 315 320

Leu Thr Ala Phe Tyr Ile Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met

325 330 335

Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asp Thr Val Lys Tyr

340 345 350

14 / 66

Phe Lys Lys Ile Met Leu Leu His Trp Lys Ala Ser Tyr Asn Gly Gly

355

360

365

Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ile Gly Met Pro Ala Thr

370

375

380

Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys

385

390

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1116

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

atgccagcca acttcacaga gggcagcttc gattccagtg ggaccggca gacgctggat 60  
tcttccccag tggcttgcac taaaacagtg acttttactg aagtggtgga aggaaaggaa 120  
tggggttcct tctactactc cttaagact gagcaattga taactctgtg ggtcctcttt 180  
gtttttacca ttgttgaaa ctccgttgtg ctttttcca catggaggag aaagaagaag 240  
tcaagaatga ctttcttgt gactcagctg gccatcacag attttcac aggactggc 300  
aacatcttga cagatattaa ttggcgattc actggagact tcacggcacc tgacctgggt 360  
tgcccgagtgg tccgttattt gcaggttgtg ctgtctacg cctctaccta cgtcctgggt 420  
tccctcagca tagacagata ccatgccatc gtctacccca tgaagttcct tcaaggagaa 480  
aagcaagcca gggtcctcat tgtgatgcc tggagcctgt ctttctgtt ctccattccc 540  
accctgatca tatttggaa gaggacactg tccaaacggtg aagtgcagtg ctggccctg 600

15 / 66

tggcctgacg actcctactg gacccatac atgaccatcg tggccttctt ggttacttc 660  
atccctctga caatcatcg catcatgtat ggcattgtga tccgaactat ttggattaaa 720  
agcaaaaacct acgaaacagt gatttccaac tgctcagatg ggaaactgtg cagcagctat 780  
aaccgaggac tcatctcaaa ggcaaaaatc aaggctatca agtatacgat catcatcatt 840  
tttgccttca tctgctgttg gagtccatac ttccctgtttg acattttgga caatttcaac 900  
ctccttccag acacccagga gcgtttctat gcctctgtga tcattcagaa cctgccagca 960  
ttgaatagtg ccatcaaccc cctcatctac tgtgtcttca gcagctccat ctctttcccc 1020  
tgcagggagc aaagatcaca ggattccaga atgacgttcc gggagagaac tgagaggcat 1080  
gagatgcaga ttctgtccaa gccagaattc atctag 1116

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1092

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

atggcccccg gcgaggcgct gctggcggtt ctccctggta tggtaactggc cgtggcgctg 60  
ctatccaacg cactggtgct gctttgttgc gcctacagcg ctgagctccg cactcgagcc 120  
tcaggcgtcc tcctggtaa tctgtctctg ggccacctgc tgctggcgcc gctggacatg 180  
cccttcacgc tgctcggtgt gatgcgcggg cggacaccgt cggcgcccg cgcacatgcca 240  
gtcattggct tcctggacac cttcctggcg tccaaacgcgg cgctgagcgt ggcggcgctg 300  
agcgcagacc agtggctggc agtgggttc ccactgcgt acgcggacg cctgcgaccg 360  
cgctatgcgg gcctgcgtgct gggctgtgcc tggggacagt cgctggccctt ctcaggcgct 420  
gcacttggct gctcggtgc tggctacagc agcgccttcg cgtcctgttc gctgcgcctg 480  
ccggcccgagc ctgagcgtcc gcgcgttgcgc gccttcacccg ccacgcgttca tgccgtggc 540

16 / 66

ttcgtgctgc cgctggcggt gctctgcctc acctcgctcc aggtgcacccg ggtggcacgc 600  
agacactgcc agcgcatgga caccgtcacc atgaaggcgc tcgcgctgct cgccgacctg 660  
caccggcagg tgccggcagcg ctgcctcatac cagcagaagc ggcgcggcca ccgcgcacc 720  
aggaagattg gcattgctat tgcgacccctc ctcatctgct ttggcccgta tgtcatgacc 780  
aggctggcgg agctcggtcc ctgcgtcacc gtgaacgccc agtggggcat cctcagcaag 840  
tgcctgaccc acagcaaggc ggtggccgac ccgttcaagt actctctgct ccgcggccg 900  
ttccgccaag tcctggccgg catggtgcac cggctgctga agagaacccc ggcgcggcca 960  
tccacccatg acagctctt gatatgtggcc ggcattggc accagctgct gaagagaacc 1020  
ccgcgcggccag cgtccacccca caacggctct gtggacacag agaatgattc ctgcctgcag 1080  
cagacacact ga 1092

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1260

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

atgctggcag ctgccttgc agactctaac tccagcagca tgaatgtgtc ctttgctcac 60  
ctccacttttgc cggagggtta cctgcctct gattcccagg actggagaac catcatcccg 120  
gctctttgg tggctgtctg cctgggtggc ttcgtggaa acctgtgtgt gattggcattc 180  
ctccttcaca atgcttgaa aggaaagcca tccatgatcc actccctgat tctgaatctc 240  
agcctggctg atctctccct cctgctgttt tctgcaccta tccgagctac ggcgtactcc 300  
aaaagtgttt gggatctagg ctgggtttgtc tgcaagtcct ctgactggtt tatccacacaca 360  
tgcattggcag ccaagagcct gacaatcggtt gtgggtggcca aagtatgctt catgtatgca 420  
agtgacccag ccaagcaagt gagtatccac aactacacca tctggtcagt gctgggtggcc 480

17 / 66

atctggactg tggctagcct gttaccctg ccggaatggt tctttacac catcaggcat 540  
catgaagggtg tggaaatgtg cctcggtat gtaccagctg tggctgaaga gtttatgtcg 600  
atgtttggta agctctaccc actcctggca tttggccttc cattatttt tgccagctt 660  
tatttctgga gagcttatga ccaatgtaaa aaacgaggaa ctaagactca aaatcttaga 720  
aaccagatac gctcaaagca agtcacagtg atgctgctga gcattgccat catctctgct 780  
gtcttgcgc tccccgaatg ggtagcttg ctgtgggtat ggcacatctgaa ggctgcaggc 840  
ccggccccac cacaagggtt catagccctg tctcaagtct tgcatttttc catctcttca 900  
gcaaattctc tcattttct tgtgtatgtcg gaagagttca gggaaaggctt gaaagggtgt 960  
tgaaaaatgga tgataaccaa aaaacctcca actgtctcag agtctcagga aacaccagct 1020  
ggcaactcag agggcttcc tgacaagggtt ccatctccag aatccccagc atccatacca 1080  
aaaaaaagaga aaccctcagtc tccctcctct ggcaaaggaa aaactgagaa ggcagagatt 1140  
cccatccttc ctgacgtaga gcagttttgg catgagaggg acacagtccc ttctgtacag 1200  
gacaatgacc ctatccctg ggaacatgaa gatcaagaga caggggaagg tggtaatag 1260

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1182

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

atggagacca ccatggggtt catggatgac aatgccacca acacttccac cagttcctt 60  
tctgtgctca accctcatgg agcccatgcc acttccttcc cattcaactt cagctacagc 120  
gactatgata tgccttgga tgaagatgag gatgtgacca attccaggac gttcttgct 180  
gccaagatttgcattggat ggccctggtg ggcacatgc tggctgcgg cattggaaac 240  
ttcatcttta tcgctgccctt ggtccgctac aagaaaactgc gcaacactcac caacctgctc 300

18 / 66

atcgccaacc tggccatctc tgacttcctg gtggccattg tctgctgccc ctttgagatg 360  
gactactatg tggtgccca gctctcctgg gagcacggcc acgtctgtg cacctctgtc 420  
aactacctgc gcactgtctc tctctatgtc tccaccaatg ccctgctggc catcgccatt 480  
gacaggtatc tggctattgt ccatccgctg agaccacgga tgaagtgcc aacagccact 540  
ggcctgattg ctttgggtgtg gacgggtgtcc atcctgatcg ccatcccttc cgcctacttc 600  
accaccgaga cggtcctcgat cattgtcaag agccaggaaa agatcttctg cggccagatc 660  
tggcctgtgg accagcagct ctactacaag tcctacttcc tctttatctt tggcatagaa 720  
ttcgtgggcc ccgtggcac catgaccctg tgctatgcc aatatcccg ggagctctgg 780  
ttcaaggcgg tccctggatt ccagacagag cagatccgca agaggctgcg ctgcccagg 840  
aagacggtcc tggtgctcat gtgcattcacc accgcctacg tgctatgctg ggccccc 900  
tacggcttca ccatcgatcg cgaattcttc cccaccgtgt ttgtgaagga gaagcactac 960  
ctcaactgcct tctacatcgat cgagtgcac gccatgagca acagcatgat caacactctg 1020  
tgcttcgtga ccgtcaagaa cgacaccgtc aagtacttca aaaagatcat gttgctccac 1080  
tggaggctt cttacaatgg cggttaagtcc agtgcagacc tggacctcaa gacaattggg 1140  
atgcctgcca ccgaagaggt ggactgcac agactaaaat aa 1182

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

1 9 / 6 6

&lt;400&gt; 9

atgccagcca acttcacaga gggcagct

28

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 10

ctagatgaat tctggcttgg acagaatc

28

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

20 / 66

<400> 11

atgggccccg gcgaggcgct gctggcgg

28

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

tcagtgtgtc tgctgcaggc aggaatca

28

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

2 1 / 6 6

&lt;400&gt; 13

atgctggcag ctgccttgc agactctaac

30

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 14

ctatttaaca cttcccttg tctttgatc

30

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

22/66

&lt;400&gt; 15

atggagacca ccatgggtt catggatg

28

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 16

ttattttagt ctgatgcagt ccacctttc

30

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 434

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 17

Met Glu Asp Leu Phe Ser Pro Ser Ile Leu Pro Pro Ala Pro Asn Ile

1

5

10

15

23 / 66

Ser Val Pro Ile Leu Leu Gly Trp Gly Leu Asn Leu Thr Leu Gly Gln

20

25

30

Gly Ala Pro Ala Ser Gly Pro Pro Ser Arg Arg Val Arg Leu Val Phe

35

40

45

Leu Gly Val Ile Leu Val Val Ala Val Ala Gly Asn Thr Thr Val Leu

50

55

60

Cys Arg Leu Cys Gly Gly Gly Pro Trp Ala Gly Pro Lys Arg Arg

65

70

75

80

Lys Met Asp Phe Leu Leu Val Gln Leu Ala Leu Ala Asp Leu Tyr Ala

85

90

95

Cys Gly Gly Thr Ala Leu Ser Gln Leu Ala Trp Glu Leu Leu Gly Glu

100

105

110

Pro Arg Ala Ala Thr Gly Asp Leu Ala Cys Arg Phe Leu Gln Leu Leu

115

120

125

Gln Ala Ser Gly Arg Gly Ala Ser Ala His Leu Val Val Leu Ile Ala

130

135

140

Leu Glu Arg Arg Arg Ala Val Arg Leu Pro His Gly Arg Pro Leu Pro

145

150

155

160

2 4 / 6 6

Ala Arg Ala Leu Ala Ala Leu Gly Trp Leu Leu Ala Leu Leu Ala

165

170

175

Leu Pro Pro Ala Phe Val Val Arg Gly Asp Ser Pro Ser Pro Leu Pro

180

185

190

Pro Pro Pro Pro Pro Thr Ser Leu Gln Pro Gly Ala Pro Pro Ala Ala

195

200

205

Arg Ala Trp Pro Gly Gln Arg Arg Cys His Gly Ile Phe Ala Pro Leu

210

215

220

Pro Arg Trp His Leu Gln Val Tyr Ala Phe Tyr Glu Ala Val Ala Gly

225

230

235

240

Phe Val Ala Pro Val Thr Val Leu Gly Val Ala Cys Gly His Leu Leu

245

250

255

Ser Val Trp Trp Arg His Arg Pro Gln Ala Pro Ala Ala Ala Pro

260

265

270

Trp Ser Ala Ser Pro Gly Arg Ala Pro Ala Pro Ser Ala Leu Pro Arg

275

280

285

Ala Lys Val Gln Ser Leu Lys Met Ser Leu Leu Leu Ala Leu Leu Phe

25 / 66

290 295 300

Val Gly Cys Glu Leu Pro Tyr Phe Ala Ala Arg Leu Ala Ala Ala Trp

305 310 315 320

Ser Ser Gly Pro Ala Gly Asp Trp Glu Gly Glu Gly Leu Ser Ala Ala

325 330 335

Leu Arg Val Val Ala Met Ala Asn Ser Ala Leu Asn Pro Phe Val Tyr

340 345 350

Leu Phe Phe Gln Ala Gly Asp Cys Arg Leu Arg Arg Gln Leu Arg Lys

355 360 365

Arg Leu Gly Ser Leu Cys Cys Ala Pro Gln Gly Gly Ala Glu Asp Glu

370 375 380

Glu Gly Pro Arg Gly His Gln Ala Leu Tyr Arg Gln Arg Trp Pro His

385 390 395 400

Pro His Tyr His His Ala Arg Arg Glu Pro Leu Asp Glu Gly Leu

405 410 415

Arg Pro Pro Pro Pro Arg Pro Arg Pro Leu Pro Cys Ser Cys Glu Ser

420 425 430

2 6 / 6 6

Ala Phe

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 451

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 18

Met Glu Ser Ser Pro Ile Pro Gln Ser Ser Gly Asn Ser Ser Thr Leu

1

5

10

15

Gly Arg Val Pro Gln Thr Pro Gly Pro Ser Thr Ala Ser Gly Val Pro

20

25

30

Glu Val Gly Leu Arg Asp Val Ala Ser Glu Ser Val Ala Leu Phe Phe

35

40

45

Met Leu Leu Leu Asp Leu Thr Ala Val Ala Gly Asn Ala Ala Val Met

50

55

60

Ala Val Ile Ala Lys Thr Pro Ala Leu Arg Lys Phe Val Phe Val Phe

65

70

75

80

His Leu Cys Leu Val Asp Leu Leu Ala Ala Leu Thr Leu Met Pro Leu

27 / 66

85 90 95

Ala Met Leu Ser Ser Ser Ala Leu Phe Asp His Ala Leu Phe Gly Glu

100 105 110

Val Ala Cys Arg Leu Tyr Leu Phe Leu Ser Val Cys Phe Val Ser Leu

115 120 125

Ala Ile Leu Ser Val Ser Ala Ile Asn Val Glu Arg Tyr Tyr Tyr Val

130 135 140

Val His Pro Met Arg Tyr Glu Val Arg Met Thr Leu Gly Leu Val Ala

145 150 155 160

Ser Val Leu Val Gly Val Trp Val Lys Ala Leu Ala Met Ala Ser Val

165 170 175

Pro Val Leu Gly Arg Val Ser Trp Glu Glu Gly Ala Pro Ser Val Pro

180 185 190

Pro Gly Cys Ser Leu Gln Trp Ser His Ser Ala Tyr Cys Gln Leu Phe

195 200 205

Val Val Val Phe Ala Val Leu Tyr Phe Leu Leu Pro Leu Leu Leu Ile

210 215 220

2 8 / 6 6

Leu Val Val Tyr Cys Ser Met Phe Arg Val Ala Arg Val Ala Ala Met

225

230

235

240

Gln His Gly Pro Leu Pro Thr Trp Met Glu Thr Pro Arg Gln Arg Ser

245

250

255

Glu Ser Leu Ser Ser Arg Ser Thr Met Val Thr Ser Ser Gly Ala Pro

260

265

270

Gln Thr Thr Pro His Arg Thr Phe Gly Gly Gly Lys Ala Ala Val Val

275

280

285

Leu Leu Ala Val Gly Gly Gln Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Phe

290

295

300

Ser Phe His Leu Tyr Val Ala Leu Ser Ala Gln Pro Ile Ser Thr Gly

305

310

315

320

Gln Val Glu Ser Val Val Thr Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Phe Thr Ser

325

330

335

Asn Pro Phe Phe Tyr Gly Cys Leu Asn Arg Gln Ile Arg Gly Glu Leu

340

345

350

Ser Lys Gln Phe Val Cys Phe Phe Lys Pro Ala Pro Glu Glu Glu Leu

355

360

365

2 9 / 6 6

Arg Leu Pro Ser Arg Glu Gly Ser Ile Glu Glu Asn Phe Leu Gln Phe

370

375

380

Leu Gln Gly Thr Gly Cys Pro Ser Glu Ser Trp Val Ser Arg Pro Leu

385

390

395

400

Pro Ser Pro Lys Gln Glu Pro Pro Ala Val Asp Phe Arg Ile Pro Gly

405

410

415

Gln Ile Ala Glu Glu Thr Ser Glu Phe Leu Glu Gln Gln Leu Thr Ser

420

425

430

Asp Ile Ile Met Ser Asp Ser Tyr Leu Arg Pro Ala Ala Ser Pro Arg

435

440

445

Leu Glu Ser

450

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 19

30 / 66

Met Asn Gln Thr Leu Asn Ser Ser Gly Thr Val Glu Ser Ala Leu Asn

1

5

10

15

Tyr Ser Arg Gly Ser Thr Val His Thr Ala Tyr Leu Val Leu Ser Ser

20

25

30

Leu Ala Met Phe Thr Cys Leu Cys Gly Met Ala Gly Asn Ser Met Val

35

40

45

Ile Trp Leu Leu Gly Phe Arg Met His Arg Asn Pro Phe Cys Ile Tyr

50

55

60

Ile Leu Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu Leu Phe Leu Phe Ser Met Ala

65

70

75

80

Ser Thr Leu Ser Leu Glu Thr Gln Pro Leu Val Asn Thr Thr Asp Lys

85

90

95

Val His Glu Leu Met Lys Arg Leu Met Tyr Phe Ala Tyr Thr Val Gly

100

105

110

Leu Ser Leu Leu Thr Ala Ile Ser Thr Gln Arg Cys Leu Ser Val Leu

115

120

125

Phe Pro Ile Trp Phe Lys Cys His Arg Pro Arg His Leu Ser Ala Trp

130

135

140

31 / 66

Val Cys Gly Leu Leu Trp Thr Leu Cys Leu Leu Met Asn Gly Leu Thr

145 150 155 160

Ser Ser Phe Cys Ser Lys Phe Leu Lys Phe Asn Glu Asp Arg Cys Phe

165 170 175

Arg Val Asp Met Val Gln Ala Ala Leu Ile Met Gly Val Leu Thr Pro

180 185 190

Val Met Thr Leu Ser Ser Leu Thr Leu Phe Val Trp Val Arg Arg Ser

195 200 205

Ser Gln Gln Trp Arg Arg Gln Pro Thr Arg Leu Phe Val Val Val Leu

210 215 220

Ala Ser Val Leu Val Phe Leu Ile Cys Ser Leu Pro Leu Ser Ile Tyr

225 230 235 240

Trp Phe Val Leu Tyr Trp Leu Ser Leu Pro Pro Glu Met Gln Val Leu

245 250 255

Cys Phe Ser Leu Ser Arg Leu Ser Ser Ser Val Ser Ser Ala Asn

260 265 270

Pro Val Ile Tyr Phe Leu Val Gly Ser Arg Arg Ser His Arg Leu Pro

32 / 66

275 280 285

Thr Arg Ser Leu Gly Thr Val Leu Gln Gln Ala Leu Arg Glu Glu Pro

290 295 300

Glu Leu Glu Gly Gly Glu Thr Pro Thr Val Gly Thr Asn Glu Met Gly

305 310 315 320

Ala

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 333

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 20

Met Glu Lys Val Asp Met Asn Thr Ser Gln Glu Gln Gly Leu Cys Gln

1 5 10 15

Phe Ser Glu Lys Tyr Lys Gln Val Tyr Leu Ser Leu Ala Tyr Ser Ile

20 25 30

Ile Phe Ile Leu Gly Leu Pro Leu Asn Gly Thr Val Leu Trp His Phe

35 40 45

33 / 66

Trp Gly Gln Thr Lys Arg Trp Ser Cys Ala Thr Thr Tyr Leu Val Asn

50 55 60

Leu Met Val Ala Asp Leu Leu Tyr Val Leu Leu Pro Phe Leu Ile Ile

65 70 75 80

Thr Tyr Ser Leu Asp Asp Arg Trp Pro Phe Gly Glu Leu Leu Cys Lys

85 90 95

Leu Val His Phe Leu Phe Tyr Ile Asn Leu Tyr Gly Ser Ile Leu Leu

100 105 110

Leu Thr Cys Ile Ser Val His Gln Phe Leu Gly Val Cys His Pro Leu

115 120 125

Cys Ser Leu Pro Tyr Arg Thr Arg Arg His Ala Trp Leu Gly Thr Ser

130 135 140

Thr Thr Trp Ala Leu Val Val Leu Gln Leu Leu Pro Thr Leu Ala Phe

145 150 155 160

Ser His Thr Asp Tyr Ile Asn Gly Gln Met Ile Trp Tyr Asp Met Thr

165 170 175

Ser Gln Glu Asn Phe Asp Arg Leu Phe Ala Tyr Gly Ile Val Leu Thr

34 / 66

180

185

190

Leu Ser Gly Phe Leu Ser Leu Leu Gly His Phe Gly Val Leu Phe Thr

195

200

205

Asp Gly Gln Glu Pro Asp Gln Ala Arg Gly Glu Pro His Glu Asp Arg

210

215

220

Gln His Ser Pro Ser Gln Val His Pro Asp His Pro Thr Gly Val Trp

225

230

235

240

Pro Leu His Pro Leu Phe Cys Ala Leu Pro Tyr His Ser Leu Leu Leu

245

250

255

Pro His His Leu Leu Ser Ala Phe Ser Gly Leu Pro Ala Leu Asp Gly

260

265

270

Ser Gln Cys Gly Leu Gln Asp Met Glu Ala Ser Gly Glu Cys Glu Gln

275

280

285

Leu Pro Gln Pro Ser Pro Val Leu Ser Phe Lys Gly Gly Lys Asn Arg

290

295

300

Val Arg Leu Leu Gln Lys Leu Arg Gln Asn Lys Leu Gly Glu His Pro

305

310

315

320

35 / 66

Ala Gly Arg Lys Arg Cys Pro Gly Leu Asn Arg Ser Gly

325

330

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 508

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 21

Met Thr Ser Thr Cys Thr Asn Ser Thr Arg Glu Ser Asn Ser Ser His

1

5

10

15

Thr Cys Met Pro Leu Ser Lys Met Pro Ile Ser Leu Ala His Gly Ile

20

25

30

Ile Arg Ser Thr Val Leu Val Ile Phe Leu Ala Ala Ser Phe Val Gly

35

40

45

Asn Ile Val Leu Ala Leu Val Leu Gln Arg Lys Pro Gln Leu Leu Gln

50

55

60

Val Thr Asn Arg Phe Ile Phe Asn Leu Leu Val Thr Asp Leu Leu Gln

65

70

75

80

Ile Ser Leu Val Ala Pro Trp Val Val Ala Thr Ser Val Pro Leu Phe

3 6 / 6 6

85

90

95

Trp Pro Leu Asn Ser His Phe Cys Thr Ala Leu Val Ser Leu Thr His

100

105

110

Leu Phe Ala Phe Ala Ser Val Asn Thr Ile Val Val Val Ser Val Asp

115

120

125

Arg Tyr Leu Ser Ile Ile His Pro Leu Ser Tyr Pro Ser Lys Met Thr

130

135

140

Gln Arg Arg Gly Tyr Leu Leu Leu Tyr Gly Thr Trp Ile Val Ala Ile

145

150

155

160

Leu Gln Ser Thr Pro Pro Leu Tyr Gly Trp Gly Gln Ala Ala Phe Asp

165

170

175

Glu Arg Asn Ala Leu Cys Ser Met Ile Trp Gly Ala Ser Pro Ser Tyr

180

185

190

Thr Ile Leu Ser Val Val Ser Phe Ile Val Ile Pro Leu Ile Val Met

195

200

205

Ile Ala Cys Tyr Ser Val Val Phe Cys Ala Ala Arg Arg Gln His Ala

210

215

220

37 / 66

Leu Leu Tyr Asn Val Lys Arg His Ser Leu Glu Val Arg Val Lys Asp

225

230

235

240

Cys Val Glu Asn Glu Asp Glu Glu Gly Ala Glu Lys Lys Glu Glu Phe

245

250

255

Gln Asp Glu Ser Glu Phe Arg Arg Gln His Glu Gly Glu Val Lys Ala

260

265

270

Lys Glu Gly Arg Met Glu Ala Lys Asp Gly Ser Leu Lys Ala Lys Glu

275

280

285

Gly Ser Thr Gly Thr Ser Glu Ser Ser Val Glu Ala Arg Gly Ser Glu

290

295

300

Glu Val Arg Glu Ser Ser Thr Val Ala Ser Asp Gly Ser Met Glu Gly

305

310

315

320

Lys Glu Gly Ser Thr Lys Val Glu Glu Asn Ser Met Lys Ala Asp Lys

325

330

335

Gly Arg Thr Glu Val Asn Gln Cys Ser Ile Asp Leu Gly Glu Asp Asp

340

345

350

Met Glu Phe Gly Glu Asp Asp Ile Asn Phe Ser Glu Asp Asp Val Glu

355

360

365

38 / 66

Ala Val Asn Ile Pro Glu Ser Leu Pro Pro Ser Arg Arg Asn Ser Asn

370 375 380

Ser Asn Pro Pro Leu Pro Arg Cys Tyr Gln Cys Lys Ala Ala Lys Val

385 390 395 400

Ile Phe Ile Ile Ile Phe Ser Tyr Val Leu Ser Leu Gly Pro Tyr Cys

405 410 415

Phe Leu Ala Val Leu Ala Val Trp Val Asp Val Glu Thr Gln Val Pro

420 425 430

Gln Trp Val Ile Thr Ile Ile Trp Leu Phe Phe Leu Gln Cys Cys

435 440 445

Ile His Pro Tyr Val Tyr Gly Tyr Met His Lys Thr Ile Lys Lys Glu

450 455 460

Ile Gln Asp Met Leu Lys Lys Phe Phe Cys Lys Glu Lys Pro Pro Lys

465 470 475 480

Glu Asp Ser His Pro Asp Leu Pro Gly Thr Glu Gly Gly Thr Glu Gly

485 490 495

Lys Ile Val Pro Ser Tyr Asp Ser Ala Thr Phe Pro

39/66

500

505

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 1305

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 22

atggaggatc tcttagccc ctaattctg ccgcggcgc ccaacattc cgtccccatc 60  
ttgctggct ggggtctcaa cctgacctt gggcaaggag cccctgcctc tggccggccc 120  
agccgcccgcg tccgcctgggt gttcctgggg gtcatccctgg tggtggcggt ggcaggcaac 180  
accacagtgc tgtgcgcct gtgcggcggc ggccggccct gggccggccc caagcgtcgc 240  
aagatggact tcctgctgggt gcagctggcc ctggcggacc tgtacgcgtg cgggggcacg 300  
gcgcgttcac agctggcctg ggaactgctg ggcgagcccc gcgcggccac gggggacctg 360  
gcgtgcccgt tcctgcagct gtcgcaggca tccggcgggg gcgcctcgcc ccacctcggt 420  
gtgctcatcg ccctcgagcg cggcgccgcg gtgcgtttc cgcacggccg gcccgtgcc 480  
gcgcgtgccccc tcggccccc gggctggctg ctggcactgc tgctggcgct gccccggcc 540  
ttcgtggtgc gcggggactc cccctcgccg ctggcggccgc gcgcggccac aacgtccctg 600  
cagccaggcg cgccccggc cgccccgcgc tggccggggc agcgtcgctg ccacgggatc 660  
ttcgcgcccc tggcgcgctg gcacctgcag gtctacgcgt tctacgaggc cgtcgccggc 720  
ttcgtcgccgc ctgttacgggt cctggcgctc gcttgcggcc acctactctc cgtctgggtgg 780  
cggcacccggc cgcaaggcccc cgcggctgca gcgcctgggt cggcgagcccc aggtcgagcc 840  
cctgcgcggca gcgcgtgcc cccgcggcaag gtgcagagcc tgaagatgag cctgcgtctg 900  
gcgcgtctgt tcgtggctg cgagctggcc tactttggcg cccggctggc ggccgcgtgg 960  
tcgtccgggc cgcgggaga ctgggaggga gagggcctgt cggcggcgct gcgcgtgg 1020

40 / 66

gcgatggcca acagcgctct caatcccttc gtctacccct tcttccaggc gggcgactgc 1080  
cggctccggc gacagctgctg gaagcggctg ggctctctgt gctgcgcgcc gcagggaggc 1140  
gcggaggacg aggaggggcc ccggggccac caggcgctct accgccaacg ctggcccccac 1200  
cctcattatc accatgctcg gcggaaccg ctggacgagg gcggcttgcg cccacccct 1260  
ccgcgccccca gaccctgccc ttgctcctgc gaaagtgcct tctag 1305

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 1356

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 23

atggagtcct caccatccc ccagtcatca gggaaactctt ccactttggg gagggtccct 60  
caaaccccaag gtccctctac tgccagtggg gtcccgagg tggggctacg ggatgttgc 120  
tcggaatctg tggccctttt cttcatgctc ctgctggact tgactgctgt ggctggcaat 180  
gccgctgtga tggccgtat cgccaagacg cctgcccctcc gaaaatttgc 240  
cacctctgcc tggtgacact gctggctgcc ctgaccctca tgccctggc catgctctcc 300  
agctctgccc tctttgacca cgccctttt ggggaggtgg cctgcccctt ctacttgc 360  
ctgagcgtgt gctttgtcag cctggccatc ctctcggtgt cagccatcaa tgtggagcgc 420  
tactattacg tagtccaccc catgcgctac gaggtgcgca tgacgctggg gctggtgccc 480  
tctgtgtgg tgggtgtgt ggtgaaggcc ttggccatgg cttctgtgcc agtgttgga 540  
agggtctccct gggaggaagg agtcccagt gtcccccaag gctgttcaact ccagtggagc 600  
cacagtgcct actgccagct ttttgggtg gtctttgctg tccttactt tctgttgccc 660  
ctgctcctca tacttgtgtt ctactgcagc atgttccgag tggcccgctt ggctgcccattg 720  
cagcacgggc cgctgcccac gtggatggag acaccccgcc aacgctccga atctctcagc 780

41 / 66

agccgctcca cgatggcac cagctcgaaa gccccccaga ccacccaca ccggacgttt 840  
ggggggagggaa aagcagcagt ggttctcctg gctgtgggg gacagttcct gctctgttgg 900  
ttgcctact tctcttcca cctctatgtt gccctgagtg ctcaactggg 960  
caggggaga gtgtggcac ctggattggc tactttgtt tcacttccaa cccttcttc 1020  
tatggatgtc tcaaccggca gatccgggg gagctcagca agcagttgt ctgcttcttc 1080  
aagccagctc cagaggagga gctgaggctg cctagccggg agggctccat tgaggagaac 1140  
ttcctgcagt tcctcaggg gactggctgt cttctgagt cctgggtttc ccgaccctta 1200  
cccagccccca agcaggagcc acctgctgtt gactttcgaa tcccaggcca gatacgctgag 1260  
gagacctctg agttcctgga gcagcaactc accagcgaca tcatcatgtc agacagctac 1320  
ctccgtctg ccgcctcacc ccggctggag tcatga 1356

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 966

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 24

atgaaccaga ctttgaatag cagtggacc gtggagtcag ccctaaacta ttccagaggg 60  
agcacagtgc acacggctta cctggtgctg agctccctgg ccatgttac ctgcctgtgc 120  
gggatggcag gcaacagcat ggtgatctgg ctgctggct ttcaatgca caggaacccc 180  
ttctgcattt atatcctcaa cctggcggca gccgaccctcc tcttcctt cagcatggct 240  
tccacgctca gcctggaaac ccagccctg gtcaatacca ctgacaaggt ccacgagctg 300  
atgaagagac tcatgtactt tgcttacaca gtgggcctga gcctgctgac ggccatcagc 360  
acccagcgct gtctctgtt cctttccctt atctggttca agtgcaccg gcccaggcac 420  
ctgtcagcct ggggtgttgg cctgctgtgg acactctgtc tcctgatgaa cgggttggacc 480

4 2 / 6 6

tcttccttct gcagcaagtt ctgaaattc aatgaagatc ggtgcttcag ggtggacatg 540  
gtccaggccg ccctcatcat ggggtctta accccagtga tgactctgtc cagcctgacc 600  
ctctttgtct gggtgcggag gagctcccag cagtggccgc ggcagccac acggctgttc 660  
gtggtggtcc tggcctctgt cctggtgttc ctcatctgtt ccctgcctct gagcatctac 720  
tggtttgtgc tctactggtt gagcctgcgg cccgagatgc aggtcctgtg cttcagcttg 780  
tcacgcctct cctcgccgt aagcagcagc gccaaccccg tcatctactt cctggtggc 840  
agccggagga gccacaggct gcccaccagg tccctgggga ctgtgctcca acaggcgctt 900  
cgcgaggagc ccgagctgga aggtggggag acgcccaccc tgggcaccaa tgagatgggg 960  
gcttga 966

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 1002

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 25

atggagaagg tggacatgaa tacatcacag gaacaaggtc tctgccagtt ctcagagaag 60  
tacaagcaag tctaccttc cctggcctac agtacatct ttatccctagg gctgccacta 120  
aatggcactg tcttggtca ctctggggc caaaccaagc gctggagctg tgccaccacc 180  
tatctggta acctgatggt gggcgacctg ctttatgtgc tattgccctt cctcatcatc 240  
acctactcac tagatgacag gtggcccttc ggggagctgc tctgcaagct ggtgcacttc 300  
ctgttctata tcaaccctta cggcagcatc ctgctgctga cctgcacatc tgcaccc 360  
ttccttaggtg tgcaccc actgtgttcg ctgccttacc ggacccgcag gcatgcctgg 420  
ctggcacca gcaccacccg gcccctggc gtcctccac tgctgcccac actggcccttc 480  
tcccacacgg actacatcaa tggccagatg atctggatg acatgaccag ccaagagaat 540

43 / 66

tttgcgtggc ttttgccta cggcatagtt ctgacattgt ctggcttct ttccctcctt 600  
ggtcattttg gtgtgctatt cactgatggt caggagcctg atcaagccag aggagaacct 660  
catgaggaca ggcaacacag cccgagccag gtccatccgg accatcctac tggtgtgtgg 720  
cctttcacc ctctgttttgc tgcccttcca tatcactcgc tccttctacc tcaccatctg 780  
ctttctgctt tctcaggact gccagctctt gatggcagcc agtgtggcct acaagatatg 840  
gaggcctctg gtgagtgtga gcagctgcct caacccagtc ctgtactttc tttcaagggg 900  
ggcaaaaata gagtcaggct cctccagaaa ctgaggcaga acaagttggg tgagcatcca 960  
gctgggagga agagatgccc agggttgaac agatctgggt aa 1002

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 1527

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 26

atgacgtcca cctgcaccaa cagcacgcgc gagagtaaca gcagccacac gtgcacgtccc 60  
ctctccaaaaa tgcccatcag cctggccac ggcacatcatcc gctcaaccgt gctggttatc 120  
ttcctcgccg cctcttcgt cgcaacata gtgctggcgc tagtggca ggcacgtccg 180  
cagctgctgc aggtgaccaa ccgttttac ttaaccccttcc tggcttgcg cctgctgcag 240  
atttcgctcg tggcccccctg ggtgggtggcc acctctgtgc ctctttctg gcccctcaac 300  
agccacttct gcaacggccct ggttagcctc acccacctgt tggcttgcg cagcgtcaac 360  
accattgtct tgggtcagt ggatcgctac ttgtccatca tccaccctct ctcttacccg 420  
tccaagatga cccagcgccg cggttacctg ctccctatg gcacctggat tggccatc 480  
ctgcagagca ctcccttact ctacggctgg ggccaggctg cctttgatga ggcacatgt 540  
ctctgctcca tggatctgggg ggcacggccctt agctacacta ttctcagcgt ggtgtcccttc 600

44 / 66

atcgtcattc cactgattgt catgattgcc tgctactccg tgggttctg tgcagccgg 660  
aggcagcatg ctctgctgta caatgtcaag agacacagct tggaagtgcg agtcaaggac 720  
tgtgtggaga atgaggatga agagggagca gagaagaagg aggagttcca ggatgagagt 780  
gagtttcgcc gccagcatga aggtgaggtc aaggccaagg agggcagaat ggaagccaa 840  
gacggcagcc tgaaggccaa ggaaggaagc acggggacca gtgagagtag tgtagaggcc 900  
aggggcagcg aggaggtcag agagagcagc acgggtggcca gcgcacggcag catggaggt 960  
aaggaaggca gcaccaaagt tgaggagaac agcatgaagg cagacaaggg tcgcacagag 1020  
gtcaaccagt gcagcattga ctgggtgaa gatgacatgg agtttgta agacgacatc 1080  
aatttcagtg aggatgacgt cgaggcagtg aacatcccgg agacccccc acccagtct 1140  
cgtaacagca acagcaaccc tcctctgccc aggtgctacc agtgcaaagc tgctaaagt 1200  
atcttcatca tcattttctc ctatgtgcta tccctggggc cctactgctt tttagcagtc 1260  
ctggccgtgt gggtggatgt cgaaacccag gtaccccaagt gggtgatcac cataatcatc 1320  
tggctttct tcctgcagtg ctgcatccac ccctatgtct atggctacat gcacaagacc 1380  
attaagaagg aaatccagga catgctgaag aagttcttct gcaaggaaaa gccccgaaa 1440  
gaagatagcc acccagaccc gcccggaca gagggtgaaa ctgaaggcaa gattgtccct 1500  
tcctacgatt ctgctacttt tccttga 1527

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

45 / 66

&lt;400&gt; 27

atggaggatc tctttagccc ctcaattc

28

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 28

ctagaaggca ctttcgcagg agcaaggc

28

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

46/66

&lt;400&gt; 29

atggagtcc tacccatccc ccagtcata

29

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 30

tcatgactcc agccgggtg aggccgcag

29

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

47 / 66

&lt;400&gt; 31

atgaaccaga ctttgaatag cagtgg

26

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 32

tcaaggcccc atctcattgg tgccccacg

28

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

48 / 66

&lt;400&gt; 33

atggagaagg tggacatgaa tacatcac

28

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 34

ttacccagat ctgttcaacc ctgggcata

29

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

49/66

&lt;400&gt; 35

atgacgtcca cctgcaccaa cagcacgc

28

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 36

tcaaggaaaa gtagcagaat cgttaggaag

29

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 37

ccaggagcgt ttctatgcct

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 38

tgtgatctt gctccctgca

20

<210> 39

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc\_binding

<222> (28)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 39

tcagaacctg ccagcattga atagtgcc

28

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 40

5 2 / 6 6

atctgctttg ccccgatgt

20

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 41

accgccttgc tgttaggtcag

20

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

&lt;220&gt;

53 / 66

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc\_binding

<222> (22)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 42

tcgtgccctt cgtcaccgtg aa

22

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 43

cccagcatcc ataccagaaa a

21

5 4 / 6 6

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 44

ctgtgtccct ctcatgccaa a

21

<210> 45

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

55 / 66

&lt;223&gt; Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_binding

&lt;222&gt; (28)

&lt;223&gt; Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

&lt;400&gt; 45

tgagaaggca gagattccca tccttctt

28

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 46

tcgccatgag caacagcat

19

&lt;210&gt; 47

5 6 / 6 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 47

cactggactt accgccattg t

21

<210> 48

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

57 / 66

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_binding

&lt;222&gt; (29)

&lt;223&gt; Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

&lt;400&gt; 48

agatcatgtt gctccactgg aaggcttct

29

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 49

ggatctcttt agccctcaa ttc

23

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

5 8 / 6 6

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 50

aaggtcaggt tgagacccca g

21

<210> 51

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc\_binding

5 9 / 6 6

&lt;222&gt; (25)

&lt;223&gt; Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

&lt;400&gt; 51

aacatttccg tgcccatctt gctgg

25

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 52

gctgttact ttcgaatccc a

21

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

60 / 66

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 53

acggaggtag ctgtctgaca tga

23

<210> 54

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc\_binding

<222> (26)

<223> Label TAMRA

61 / 66

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

&lt;400&gt; 54

tgagttcctg gagcagcaac tcacca

26

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 55

ggctttcgaa tgcacaggaa

20

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:an artificially

62 / 66

## synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 56

ggaagccatg ctgaagagga 20

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized TaqMan probe sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_binding

&lt;222&gt; (1)

&lt;223&gt; Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_binding

&lt;222&gt; (28)

&lt;223&gt; Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

63 / 66

<400> 57

ttctgcatct atatcctcaa cctggcgg

28

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 58

tggcctcttc accctctgtt t

21

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

64/66

&lt;400&gt; 59

atcaagagct ggcagtcctg a

21

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized TaqMan probe sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_binding

&lt;222&gt; (1)

&lt;223&gt; Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_binding

&lt;222&gt; (30)

&lt;223&gt; Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

&lt;400&gt; 60

tccatatac tcgctccttc tacctcacca

30

65 / 66

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 61

ccaaaatgcc catcagcct

19

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 62

gcactatgtt gccgacgaaa

20

6 6 / 6 6

<210> 63

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized TaqMan probe sequence

<220>

<221> misc\_binding

<222> (1)

<223> Label FAM (6-carboxy-fluorescein)

<220>

<221> misc\_binding

<222> (26)

<223> Label TAMRA

(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)

<400> 63

catccgctca accgtgctgg ttatct

26

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09408

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/705, C07K16/28, C12P21/02, C12Q1/02, C12Q1/68, A61K31/711, A61K48/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/09, C07K14/705

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GeneBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 8-245697, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 24 September, 1996 (24.09.96) (Family: none)	1-15,17
A	WO, 98/46620, A1 (MILLENNIUM PHARM INC), 22 January, 1998 (22.01.98) & AU, 9869736, A & US, 5891720, A & EP, 1007536, A1	1-15,17
A	WO, 99/37679, A1 (MILLENNIUM PHARM INC), 29 July, 1999 (29.07.99) & US, 5945307, A & AU, 9922369, A & EP, 1056777, A1	1-15,17

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

• Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
27 March, 2001 (27.03.01)Date of mailing of the international search report  
10 April, 2001 (10.04.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09408

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 16  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The invention as set forth in claim 16 pertains to methods for diagnosis of diseases and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 15 and 17 are divided into groups of 9 individual inventions, i.e., inventions relating to DNAs encoding the amino acids of SEQ ID NOS:1 to 4 and 17 to 21, and DNAs having the sequences of SEQ ID NOS:5 to 8 and 22 to 26. These groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Claims 1 to 15 and 17 (inventions relating to the DNA encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 and the DNA having the sequence of SEQ ID NO:5)

Remark on Protest  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/705, C07K16/28, C12P21/02, C12Q1/02, C12Q1/68, A61K 31/711, A61K48/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C12N15/00~15/09, C07K14/705

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

GeneBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 8-245697, A (武田薬品工業株式会社) 24. 9 月. 1996 (24. 09. 96) (ファミリーなし)	1-15, 1 7
A	WO, 98/46620, A1 (MILLENNIUM PHARM INC) 22. 1 月. 1998 (22. 01. 98) &AU, 9869736, A& US, 5891720, A&EP, 1007536, A1	1-15, 1 7
A	WO, 99/37679, A1 (MILLENNIUM PHARM INC) 29. 7 月. 1999 (29. 07. 99) &US, 5945307, A& AU, 9922369, A&EP, 1056777, A1	1-15, 1 7

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 27. 03. 01	国際調査報告の発送日 10.04.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 鈴木 恵理子 4N 8114 印

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## 第一欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT第17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲16の発明は、疾病の診断方法に該当し、特許協力条約第17条(2)(a)(i)及び特許協力条約に基づく規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をできる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第二欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-15, 17に記載された発明は、配列番号1-4, 17-21のアミノ酸配列をコードするDNA、または配列番号5-8, 22-26の配列を有するDNAに係る発明群という、個々の9の発明に区分され、当該発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは、認められない。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-15, 17 (配列番号1のアミノ酸配列をコードするDNA、及び配列番号5の配列を有するDNAに係る部分の発明)

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。